

UNTERSUCHUNGEN ZUM VERHALTEN
DES ACETALDEHYDS IM MENSCHLICHEN BLUT
MIT ZWEI VERSCHIEDENEN
GASCHROMATOGRAPHISCHEN VERFAHREN

von

PETER SCHÖNIGER

aus

FEUCHTWANGEN

*Diss. Erlangen
1984*

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. H. B. Wuermeling

UNTERSÜCHUNGEN ZUM VERHALTEN
DES ACETALDEHYDS IM MENSCHLICHEN BLUT
MIT ZWEI VERSCHIEDENEN
GASCHROMATOGRAPHISCHEN VERFAHREN

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

PETER SCHÖNIGER
aus
FEUCHTWANGEN

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. G. Machbert
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.1984

1. Stammbaum	1
2. Stammbaum	2
3. Stammbaum	3
4. Stammbaum	4
5. Stammbaum	5
6. Stammbaum	6
7. Stammbaum	7
8. Stammbaum	8
9. Stammbaum	9
10. Stammbaum	10
11. Stammbaum	11
12. Stammbaum	12
13. Stammbaum	13
14. Stammbaum	14
15. Stammbaum	15
16. Stammbaum	16
17. Stammbaum	17
18. Stammbaum	18
19. Stammbaum	19
20. Stammbaum	20
21. Stammbaum	21
22. Stammbaum	22
23. Stammbaum	23
24. Stammbaum	24
25. Stammbaum	25
26. Stammbaum	26
27. Stammbaum	27
28. Stammbaum	28
29. Stammbaum	29
30. Stammbaum	30
31. Stammbaum	31
32. Stammbaum	32
33. Stammbaum	33
34. Stammbaum	34
35. Stammbaum	35
36. Stammbaum	36
37. Stammbaum	37
38. Stammbaum	38
39. Stammbaum	39
40. Stammbaum	40
41. Stammbaum	41
42. Stammbaum	42
43. Stammbaum	43
44. Stammbaum	44
45. Stammbaum	45
46. Stammbaum	46
47. Stammbaum	47
48. Stammbaum	48
49. Stammbaum	49
50. Stammbaum	50
51. Stammbaum	51
52. Stammbaum	52
53. Stammbaum	53
54. Stammbaum	54
55. Stammbaum	55
56. Stammbaum	56
57. Stammbaum	57
58. Stammbaum	58
59. Stammbaum	59
60. Stammbaum	60
61. Stammbaum	61
62. Stammbaum	62
63. Stammbaum	63
64. Stammbaum	64
65. Stammbaum	65
66. Stammbaum	66
67. Stammbaum	67
68. Stammbaum	68
69. Stammbaum	69
70. Stammbaum	70
71. Stammbaum	71
72. Stammbaum	72
73. Stammbaum	73
74. Stammbaum	74
75. Stammbaum	75
76. Stammbaum	76
77. Stammbaum	77
78. Stammbaum	78
79. Stammbaum	79
80. Stammbaum	80
81. Stammbaum	81
82. Stammbaum	82
83. Stammbaum	83
84. Stammbaum	84
85. Stammbaum	85
86. Stammbaum	86
87. Stammbaum	87
88. Stammbaum	88
89. Stammbaum	89
90. Stammbaum	90
91. Stammbaum	91
92. Stammbaum	92
93. Stammbaum	93
94. Stammbaum	94
95. Stammbaum	95
96. Stammbaum	96
97. Stammbaum	97
98. Stammbaum	98
99. Stammbaum	99
100. Stammbaum	100

Meinem Vater und
meiner verstorbenen Mutter
gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

A) EINLEITUNG	Seite
1. Allgemeiner Teil	1
2. Ziel der Arbeit	4
B) EIGENE UNTERSUCHUNGEN	5
I. Material und Methode	5
1. Geräte, Chemikalien, Lösungen	5
1.1 Geräte	5
1.2 Kleinmaterial	5
1.3 Chemikalien	6
1.4 Lösungen	6
1.4.1 Acetaldehyd-Stamm- und Standardlösungen	6
1.4.2 Innerer Standard Isopropanol	7
1.4.3 Pufferlösungen	8
2. Probanden und Untersuchungsmaterial	9
2.1 Probanden	9
2.2 Blutgewinnung	10
2.3 Gewinnung des Plasmas	10
2.4 Gewinnung der Erythrocyten	10
2.5 Gewinnung des Hämolysats	11
3. Gaschromatographische Acetaldehyd- bestimmung	11
3.1 Gaschromatographische Arbeitsbe- dingungen	11
3.2 Die verschiedenen verwendeten Bestim- mungsmethoden	12
3.2.1 Bestimmungsmethode A	12
3.2.2 Bestimmungsmethode B	12
3.3 Probenansatz	12
3.4 Ermittlung der Eichfaktoren	13
3.5 Berechnung des Acetaldehydgehaltes in der Probe	14

4.	Bestimmung des Hb-Gehaltes mit der Cyan-Met-Hb-Methode	15
4.1	Prinzip der Methode	15
4.2	Probenansatz	15
4.3	Die Messung	16
5.	Berechnung der enzymkinetischen Parameter $V_{\max}$ (max. Geschwindigkeit) und k_m (Michaelis-Konstante)	16
5.1	$V_{\max}$ - und k_m -Berechnungen nach Michaelis und Menten sowie Lineweaver und Burk	16
5.2	k_m - und $V_{\max}$ -Berechnungen bei Bestimmungsmethode A	18
5.3	k_m - und $V_{\max}$ -Berechnungen bei Bestimmungsmethode B	18
6.	Versuchsbeschreibungen	19
6.1	Versuche mit menschlichem Vollblut	19
6.2	Versuche mit menschlichem Plasma	20
6.3	Versuche mit menschlichen Erythrocyten	20
6.3.1	ACH-Bestimmungsmethode A	20
6.3.2	ACH-Bestimmungsmethode B	20
	a) in intakten Erythrocyten	20
	b) in hitzedenaturierten Erythrocyten	21
6.4	Versuche mit Hämolysat menschlicher Erythrocyten	21
6.4.1	ACH-Bestimmungsmethode A im dialysierten Hämolysat	21
	a) ohne NAD-Zusatz	21
	b) mit NAD-Zusatz	22
6.4.2	ACH-Bestimmungsmethode B im dialysierten Hämolysat	22
	a) ohne NAD-Zusatz	22
	b) mit NAD-Zusatz	22

6.4.3 ACH-Bestimmungsmethode B im	
hitzedenaturierten Hämolysat	23
a) ohne NAD-Zusatz	23
b) mit NAD-Zusatz	23
II. Ergebnisse	24
1. Verhalten des in vitro zugesetzten	
Acetaldehyds im menschlichen Vollblut	24
2. Verhalten des in vitro zugesetzten	
Acetaldehyds im menschlichen Plasma	28
3. Verhalten des in vitro zugesetzten	
Acetaldehyds in menschlichen Ery-	
throcyten	30
4. Verhalten des in vitro zugesetzten	
Acetaldehyds im Hämolysat mensch-	
licher Erythrocyten	38
C) DISKUSSION	49
D) ZUSAMMENFASSUNG	60
E) LITERATURVERZEICHNIS	62

A) EINLEITUNG

1. Allgemeiner Teil

In den letzten Jahren weist eine zunehmende Zahl von Untersuchungen auf eine pathogene Rolle des Acetaldehyds bei Alkoholkrankheiten hin.

So berichten ASMUSSEN et al. (2) bereits 1948 von Alkoholintoxikationsphänomenen nach Acetaldehydverabreichung. 1975 beschreiben KOSTEN et al. (12), daß bei Nicht-Alkoholikern nach Alkoholgenuß eine niedrigere Acetaldehydkonzentration im Blut feststellbar ist als bei Alkoholikern. MIZOI et al. (15) stellten bei Personen mit "facial-flushing-Syndrom", als Ausdruck der verstärkten Alkoholempfindlichkeit, eine außerordentlich stark erhöhte Acetaldehyd-Blutkonzentration fest.

Diese verstärkte Alkoholempfindlichkeit wird vor allem dem aus Äthanol entstehenden Acetaldehyd zugeschrieben (5, 12).

Ein erhöhter Acetaldehydspiegel kann entweder durch eine verstärkte Bildung des Acetaldehyds, durch seinen verlangsamten Abbau, oder durch Kombination beider Vorgänge entstehen (25).

Deshalb liegt es nahe, daß in der letzten Zeit der Stoffwechsel des Acetaldehyds, bzw. genetisch bedingte Varianten der acetaldehydbildenden und acetaldehydabbauenden Enzyme in den Mittelpunkt des Interesses gerückt sind (7).

Acetaldehyd, der im menschlichen Stoffwechsel nur in geringen Mengen entsteht (13, 24), zeigt einen deutlichen Konzentrationsanstieg nach Äthanolgenuß (1). Er entsteht während der Alkoholoxydation aus Äthanol hauptsächlich durch die Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD)-abhängige Alkoholdehydrogenase (ADH) (24), die vor allem in der Leber, aber auch in anderen Organen nachgewiesen werden kann (16).

Daneben spielen bei der Acetaldehydbildung durch Äthanoloxydation in geringerem Maße noch das "microsomal ethanol oxidizing system" (MEOS) der Leber, sowie die Katalase eine Rolle (14), wobei die prozentuale Beteiligung dieser beiden Abbauewege nicht genau bekannt ist.

Die Dimerstruktur der Alkoholdehydrogenase entsteht durch die Kombination dreier Untereinheiten (α, β, γ), deren Synthese durch drei verschiedene Genloci kontrolliert wird (19-22). Die verschiedenen Dimere werden als ADH 1, ADH 2, ADH 3 bezeichnet. Für ADH 2 und ADH 3 ist ein Polymorphismus nachweisbar (3, 6).

Abgebaut wird der Acetaldehyd vor allem in der Leber durch die Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD)-abhängige Aldehyddehydrogenase (ALDH). 1977 gelang es PETERSON et al. (17) aus der Rattenleber vier verschiedene ALDH-Isoenzyme zu isolieren. Dabei unterschied er zwei cytosolische Enzyme, das τ Enzym mit einer k_m für Acetaldehyd von 22 mM und das ϕ Enzym mit einer k_m für Acetaldehyd von ca. 2,7 mM, von den beiden mitochondrialen Enzymen, dem Enzym I mit einer k_m für Acetaldehyd von 10 μ M und dem Enzym II mit einer k_m für Acetaldehyd von ca. 0,9 - 1,7 mM.

GREENFIELD und PIETRUSKO (8) konnten aus der menschlichen Leber zwei ALDH-Isoenzyme (Enzym I und II) isolieren und reinigen. Für Enzym I bestimmten sie ein Molekulargewicht von $M_r = 225.000$ einen hohen k_m -Wert für NAD und einen niedrigen für Acetaldehyd; Enzym II hat bei einem Molekulargewicht von $M_r = 245.000$ einen niedrigen k_m -Wert für NAD und einen relativ hohen für Acetaldehyd. Enzym I und II werden aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 54.000 gebildet; BLAIR und BODLEY (4) haben eine Tetramerstruktur vorgeschlagen.

HARADA et al. (9) konnten mit einer elektrophoretischen Auftrennungsmethode vier Isoenzyme der Aldehyddehydrogenase (ALDH I-IV) nachweisen. Für diese ALDH-Isoenzyme I-IV wurden von GOEDDE und AGARWAL (7) folgende Michaelis-konstanten berechnet:

Substrat Propionaldehyd: 0,0035; 0,094; 0,93 und
1,4 mmol/l

Substrat NAD: 0,065; 0,024; 0,028; 0,049 mmol/l.

Ähnliche Unterschiede wurden auch für das Substrat Acetaldehyd gefunden.

In verschiedenen anderen Geweben wie Lunge, Muskel, Herz, Darm, Haut, Niere ist ALDH elektrophoretisch nachweisbar (9), wobei nicht in allen Organen immer alle Isoenzymbande sichtbar sind. So zeigt sich im Lymphocyten nur die ALDH I und II, im Erythrocyten nur ALDH II, während im Thrombocyten sowie im Plasma keine ALDH-Bande zu beobachten sind.

Weitere Untersuchungen über Aldehyddehydrogenase im menschlichen Blut wurden von INOUE et al. (10, 11) durchgeführt. Er reinigte und isolierte die Erythrocyten-ALDH und fand eine NAD-abhängige ALDH mit einem Molekulargewicht von $M_r = 210.000$, welche sich aus vier gleichen Ketten mit dem Molekulargewicht von je $M_r = 51.500$ zusammensetzt und wahrscheinlich Tetramerstruktur hat.

Dieses Enzymsystem ist durch Disulfiram nicht kompetitiv hemmbar. Durch spektrometrische Untersuchungen bestimmte er am pH-Optimum von 8,6 die k_m für Acetaldehyd im niedrigen Substrat-Konzentrationsbereich (0-70 μM) zu 17 μM , im hohen Substrat-Konzentrationsbereich (0,8-20 mM) zu 830 μM .

Durch gaschromatographische Acetaldehyd-Bestimmung im Erythrocytenhämolysat ermittelte er bei pH 7,4 eine k_m für Acetaldehyd von ca. 700 μM , wobei er eine Methode verwendete, bei welcher der Acetaldehyd erst nach Enteiweißung im wässrigen Überstand bestimmt wird. Durch diesen Enteiweißungsprozeß wird möglicherweise nicht nur der freie, sondern auch ein Teil des gebundenen Acetaldehyds bestimmt (18).

Ähnliche Probleme entstehen bei in-vivo-Versuchen, bei denen nach Alkoholgenuß die Kinetik der Acetaldehydbildung und des -abbaues gaschromatographisch bestimmt werden soll.

Hier wird durch den Enteiweißungsprozeß eine Neubildung von Acetaldehyd aus dem in den Proben vorhandenen Äthanol hervorgerufen (23), sodaß die erhaltenen Ergebnisse in der Aussagekraft eingeschränkt sind. Deshalb gingen Bemühungen verschiedener Autoren (18) dahin, eine Acetaldehyd-Bestimmungsmethode in proteinhaltigen Proben zu entwickeln, bei welcher der Enteiweißungsprozeß vermieden wird.

2. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll das Verhalten des Acetaldehyds im menschlichen Blut, Plasma, Erythrocyten-suspensionen sowie im Erythrocytenhämolysat unter Verwendung einer gaschromatographischen Methode (Bestimmungsmethode B) ermitteln, die es ermöglicht, den Acetaldehyd in eiweißhaltigen Proben zu bestimmen, ohne daß eine vorausgehende Enteiweißung notwendig ist.

Die so erhaltenen Ergebnisse sollen mit den Ergebnissen verglichen werden, die mit der von INOUE et al. (10) beschriebenen gaschromatographischen Methode (Bestimmungsmethode A) erhalten werden, bei welcher der Acetaldehyd im eiweißfreien wässrigen Probenüberstand bestimmt wird.

B) Eigene Untersuchungen

I. Material und Methode

1. Geräte, Chemikalien, Lösungen

1.1 Geräte

- Gaschromatograph Perkin Elmer Multifract F-42 mit Wasserbad und Trennsäule: 1,5 m Stahlsäule Polyäthylenglykol 1500 (15 %) auf Kieselgur 60 - 100 mesh
- Integrator Hewlett-Packard, Modell 3380 A
- Spektralphotometer Beckmann, Modell 24
- Zentrifuge Rote-Silenta Hettrich 7000 U/min
- Hochgeschwindigkeitszentrifuge Beckmann Modell A

1.2 Kleinmaterial

- 22 ml Probenfläschchen mit Gummistopfen und Aluminiumbördel, dazu passende Verschlußzange
- Vollpipetten 0,2 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml
- Kolbenhubpipetten 100 µl, 500 µl
- 20 µl-Einmalmikropipetten (Hb-Pipetten)
- Erlenmeyerkolben verschiedener Größe
- 100-ml-Erlenmeyerkolben mit eingeschliffenem Stopfen
- Meßkolben 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml
- Reagenzgläser
- verschraubbare Reagenzgläser mit eingelegter Gummidichtung
- Blutentnahmegerät E 1,5 K
- Einmalspritzen und -kanülen
- 10 ml Serummonovetten
- 10 mm-Küvetten
- Magnetprüher
- Analysenmixer
- Dialyseschläuche Viskin (Serra-Feinbiochemika) Porengröße: 24 Ångström

1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien sind von analytischem Reinheitsgrad.

- Aqua bidestillata
- Liquemin 25000 E/5 ml
- Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) der Fa. Boehringer Mannheim GmbH
- Cyanhämglobin-Reagenz ASID
- Acetaldehyd p. a.
- Isopropanol
- Natriumdihydrogenphosphat 1-hydrat
- Dinatriumhydrogenphosphat
- Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)/HCL-Puffer
- 12 % Perchlorsäure
- physiologische Kochsalzlösung

1.4 Lösungen

1.4.1 Acetaldehyd-Stamm- und Standardlösungen

Zur Herstellung der Stammlösung wurde eine gewisse Menge eiskalten, doppelt destillierten ACH der Firma Merck abgewogen und in 100 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst. Die Schwierigkeit des exakten Abwiegens einer ACH-Menge besteht darin, den durch seinen niedrigen Siedepunkt von 20,2° C bedingten Verdunstungsverlust möglichst klein zu halten. Dies kann einerseits durch Senkung seiner Temperatur und somit des Dampfdruckes, andererseits durch Minimierung der Verdunstungsoberfläche geschehen.

Deshalb wählten wir folgendes Vorgehen:

Das in einer Bunsenbrennerflamme ca. 15 cm lang kapillär ausgezogene Ende einer 2 ml Glasampulle von bekanntem Gewicht wurde in kalten, doppelt destillierten ACH getaucht, während das ampulläre Ende in Trockeneis gebettet wurde, wodurch wegen der starken Temperatursenkung ein Unterdruck in der Ampulle erzeugt und der ACH durch das kapilläre Ende in die Ampulle gesaugt worden ist.

Da somit die Verdunstungs Oberfläche auf die kapilläre Oberfläche beschränkt und die ACH-Verdunstung dadurch vernachlässigbar klein ist, konnte nun die sich in der Ampulle befindliche ACH-Menge auf einer Analysenwaage bestimmt werden. Die jetzt bekannte ACH-Menge wurde in der Ampulle in einen, mit eiskalter physiologischer NaCl-Lösung gefüllten Erlenmeyer-Kolben gegeben, die Ampulle mit einem Glasstab zerdrückt und der Kolben mit physiologischer NaCl-Lösung bis zur 100 ml-Marke aufgefüllt.

Auf diese Art und Weise war es möglich, trotz der großen Flüchtigkeit des ACH eine ACH-Stammlösung mit genau definierter Konzentration herzustellen. Die Stammlösungen, die wir herstellten, lagen in einem Konzentrationsbereich zwischen 20 mM und 25 mM ACH.

Aus diesen Stammlösungen wurden täglich die Standardlösungen durch Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellt, in denen schließlich der ACH in einer Konzentration von 2 mM, 1,5 mM, 1,0 mM und 0,5 mM vorlag. Die ACH-Stammlösung wurde in einem Erlenmeyer-Kolben mit eingeschliffenem Glasstopfen bei 2° C im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Herstellung der Standardlösungen wurde der Kolben nur kurzzeitig zur Entnahme der benötigten hochkonzentrierten ACH-Menge geöffnet. Da aber selbst bei schnellstem Arbeiten ACH-Verluste durch Verdunsten nicht zu verhindern sind, wurde, um eine größere Konzentrationsabnahme zu vermeiden, alle drei Wochen eine neue ACH-Stammlösung hergestellt.

1.4.2 Innerer Standard Isopropanol

Als innerer Standard wurde Isopropanol verwendet. Dazu wurden 0,127 ml der doppelt destillierten Stammlösung in 100 ml NaCl-Lösung gegeben.

2 ml davon wurden dann in 100 ml des jeweiligen ACH-Standards gelöst.

1.4.3 Pufferlösungen

- Isotonische NaCl-10mM Tris/HCl-Pufferlösung pH 7,4:

Die Pufferlösung setzt sich aus den folgenden zwei Lösungen zusammen:

Lösung I : 1,21 g Tris/HCl ad 1000 ml Aqua bidestillata
(= 10 mM Tris/HCl-Lösung)

Lösung II: 8,473 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidestillata
(= 145 mM NaCl-Lösung)

Durch Mischen beider Lösungen wird mit Hilfe des elektrischen pH-Meters eine Pufferlösung mit dem pH-Wert 7 hergestellt.

- 15 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,4:

Die Pufferlösung setzt sich aus den folgenden zwei Lösungen zusammen:

Lösung I : 2,069 g Natriumdihydrogenphosphat 1-hydrat
ad 1000 ml Aqua bidestillata
(= 15 mM NaH_2PO_4 -Lösung)

Lösung II: 5,372 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 1000 ml
Aqua bidestillata (= 15 mM Na_2HPO_4 -Lösung)

Durch Mischen beider Lösungen wird mit Hilfe des elektrischen pH-Meters eine Pufferlösung mit dem pH-Wert 7 hergestellt.

2. Probanden und Untersuchungsmaterial

2.1 Probanden

Für die Untersuchungen stellten sich 5 deutsche Probanden (A - E) zur Verfügung.

Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Krankheiten, Medikamente, tägliche Alkoholmenge und Alkoholverträglichkeit sind in Tab. (1) aufgeführt.

Tab. 1:

Proband	A	B	C	D	E
Alter	24	24	24	26	45
Geschlecht	♂	♀	♂	♂	♂
Körperlänge [cm]	175	165	176	176	170
Körpergewicht [kg]	66	51	63	73	78
Stoffwechsel- krankheit	-	leichte Hyperthyreose	-	-	-
tägliche Medikamente	1 x 200 mg Acetbutolol	2 x 2,5 mg Dihydroergot- aminsulfat 1x1 Ovoresta R	-	-	-
durchschnitt- liche tägliche Alkoholmenge [g]	50	25	5	20	50
Alkoholver- träglichkeit	gut*	gut	mäßig **	gut	gut

* gut: Bei der angegebenen durchschnittlichen täglich aufgenommenen Alkoholmenge treten keinerlei psychophysischen Beeinträchtigungen auf.

**mäßig: Nach Genuß geringer Alkoholmengen (weniger als 10 g täglich) treten Sodbrennen, Schwindelgefühl, Müdigkeit und Tachycardie auf.

2.2 Blutgewinnung

Die Probanden kamen am Vormittag zwischen 9.00 und 10.00 h zur Blutentnahme, nachdem sie ca. 2 Stunden vorher ein leichtes, zur Vermeidung einer Lipämie aber fettfreies Frühstück zu sich genommen hatten. Der letzte Alkoholgenuß lag in allen Fällen mindestens 24 Stunden zurück.

Während der Blutentnahme lagen die Spender auf einer Untersuchungsliege.

Zur Vermeidung von Hämolyse wurde ein Blutentnahmebesteck (Blutentnahmegerät E 1,5 K, Art.-No: 710 290), bestehend aus einer Venenkanüle mit 1,5 mm Innendurchmesser und einem Überleitungsschlauch mit einer Flaschenkanüle am Ende verwendet. Nach Punktion einer Kubital- bzw einer Unterarmhautvene wurden ca. 150 ml Blut durch den Überleitungsschlauch in einen Erlenmeyer-Kolben geleitet und unter gleichzeitigem leichtem Schwenken des Kolbens mit 15000 E. Liquemin, welches als Antikoagulatium in die Kolben vorgegeben worden war, vermischt.

2.3 Gewinnung des Plasmas

Ca. 150 ml des frisch gewonnenen Vollbluts wurden bei ca. 4000 x g in einer Laborzentrifuge 15 min. lang zentrifugiert. Danach wurde das überstehende Plasma mit einer Pipette abgehoben und ohne weitere Bearbeitung für die Versuche verwendet.

2.4 Gewinnung der Erythrocyten

Nachdem das Plasma mittels einer Pipette entfernt worden war (vgl. 2.3), wurde der auf dem Erythrocytensediment liegende "Buffy-Coat" mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und verworfen. Die zurückbleibende Erythrocytensuspension wurde dann mittels eines Glasstabes etwa 1:1 mit isotonischer NaCl-Tris-Pufferlösung (145 mM NaCl 10 mM Tris/HCL pH 7,4) vermischt und wiederum bei 4000 x g 15 min. lang zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde 3 mal wiederholt.

2.5 Gewinnung des Hämolysats

Gewaschene Erythrocyten (vgl. 2.4) wurden durch Zugabe von ca. 4 Teilen Aqua bidestillata hämolysiert und in der Ultrazentrifuge bei 30.000 x g 40 min. lang zentrifugiert. Danach wurde das überstehende stromafreie Hämolysat mit einer Pipette vorsichtig vom Sediment abgehoben und zur Entfernung des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) 20 Stunden gegen 15 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,4 dialysiert. Dazu wurden ca. 50 ml Hämolysat in einen Dialyseschlauch gefüllt und in ein 500 ml Pufferlösung enthaltendes Glasgefäß gehängt. Die Pufferlösung wurde mit einem Magnetrührer während der gesamten Dialysezeit in Bewegung gehalten, um ein optimales Konzentrationsgefälle zwischen Membraninnen- und -außenseite und somit maximalen Dialyseeffekt zu erreichen.

3. Gaschromatographische Acetaldehydbestimmung

3.1 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Das Analysengerät war ein Fraktometer F42 der Firma Perkin Elmer mit folgenden, in allen Versuchen konstanten Apparatbedingungen:

Trennsäule:	1,5 m Stahlsäule Polyäthylenglycol 1500 (15%) auf Kieselgur 60-100 mesh.
Ofen-temperatur:	70° C
Detektor:	F I D
Injektortemperatur:	130° C
Detektortemperatur:	200° C
Trärgas:	30 ml N ₂ /min
Dosierzeit:	3 sec.
Empfindlichkeit:	Range 1/ Attenuation 1
Papiervorschub:	1 cm/min.

Die Retentionszeit betrug für ACH ca. 0,45 min., für Isopropanol ca. 1,80 min.

3.2 Die verschiedenen verwendeten Bestimmungsmethoden

Zur Acetaldehydbestimmung wurde die Head-Space-Technik verwendet. Wir bestimmten den ACH mit zwei unterschiedlichen Methoden, für welche die vorstehenden Arbeitsbedingungen eingesetzt wurden.

3.2.1 Bestimmungsmethode A

Verwendet wurden die Vorschriften, wie sie von INOUE et. al (10) 1978 beschrieben worden waren. Danach wird nach 1 Stunde Inkubation bei 37° C die enzymatische Reaktion in den Proben durch Enteiweißung und Zentrifugieren gestoppt. Die ACH-Bestimmung erfolgt dann im Probenüberstand, nachdem dieser 20 min. bei 55° C Wassertemperatur im automatischen Probenwechsler equilibriert worden ist. Diese Methode wurde, wie in der Originalarbeit, nur bei den Versuchen mit Erythrocyten und Hämolysat verwendet.

3.2.2 Bestimmungsmethode B

Die Proben (Vollblut, Plasma, Erythrocyten, Hämolysat) wurden 45 min. bei 37° C Wassertemperatur im automatischen Probenwechsler inkubiert. Danach erfolgte die ACH-Bestimmung bei 37° C in den Proben.

3.3 Probenansatz

In ein Probenfläschchen mit ca. 22 ml Volumen wird 0,5 ml Probenmaterial (Plasma, Vollblut, Erythrocyten, Hämolysat) und 0,5 ml physiologische NaCl-Lösung, die 0,02 µg Isopropanol als inneren Standard und ACH in verschiedenen Konzentrationen enthält, gegeben.

Danach wird das Analysengefäß sofort mit einem Gummistopfen verschlossen und luftdicht versiegelt, indem man mit einer Verschlußzange über den Gummistopfen und den Hals des Gefäßes eine Aluminiumbördelung anbringt, die den Gummistopfen fest auf den Glasflaschenrand drückt.

In den Hämolysat-Versuchen mit NAD-Zusatz enthielt die physiologische NaCl-Lösung neben den angegebenen Mengen von Isopropanol und ACH zusätzlich 1 mM NAD.

Wir verwendeten NAD der Fa. Boehringer Mannheim GmbH. Die gebrauchsfertige NAD-Lösung wird hergestellt, indem der Inhalt eines Fläschchens der konfektionierten Trockensubstanz mit 3 ml Aqua bidestillata aufgelöst wird. Die so hergestellte Lösung hat eine Konzentration von 24 mmol/l und ist, nach Angaben des Herstellers, bei 4° C vier Wochen lang haltbar. 12,5 µl dieser NAD-Lösung, abgemessen mit Einmal-mikropipetten, gaben wir in 100 ml 0,9 % NaCl-Lösung, die ACH in verschiedenen Konzentrationen und inneren Standard Isopropanol enthielt, so daß NAD in einer Konzentration von 1 mM vorlag.

3.4 Ermittlung der Eichfaktoren

Bei der Ermittlung der Eichfaktoren geht man davon aus, daß die Menge der analysierten Stoffe ihrer ausgedrückten Peakfläche proportional ist und sich somit der Eichfaktor aus der Peakfläche des ACH, der des inneren Standards Isopropanol und der jeweiligen Konzentration der Acetaldehyd-Standardlösung nach der folgenden Formel (vgl. Gleichung 1) bestimmen läßt.

Gleichung 1:

$$\frac{F_{\text{(Isopropanol)}}}{F_{\text{(ACH)}}} \cdot C_{\text{(ACH)}} = f_n$$

In dieser Formel bedeutet $F_{\text{(Isopropanol)}}$ die der jeweiligen, als inneren Standard beigefügten Isopropanol-Menge proportionale Peakfläche, $F_{\text{(ACH)}}$ steht entsprechend für die der jeweiligen ACH-Menge proportionalen Peak-Fläche, $C_{\text{(ACH)}}$ symbolisiert die Konzentration der jeweiligen Acetaldehyd-Standardlösungen während f_n den Eichfaktor bei der jeweiligen ACH-Konzentration darstellt.

Mit Hilfe des Eichfaktors f_n läßt sich sodann aus dem Verhältnis der Peak-Fläche von ACH und Isopropanol jede unbekannte ACH-Konzentration $C_{\text{(ACH)}}$ nach folgender Formel (vgl. Gleichung 2) berechnen.

Gleichung 2:

$$C_{(ACH)} = \frac{F_{(ACH)}}{F_{(Isopropanol)}} \cdot f_n$$

Der Meßbereich lag bei all unseren Ansätzen zwischen 0 mM und 2 mM ACH. Damit der Eichfaktor f_n in diesem relativ großen Meßbereich als Konstante benutzt werden kann, wurde die ACH-Eichlösung in 2 mM, 1,5 mM, 1 mM und 0,5 mM-Konzentration eingesetzt.

Hierzu wurden mit einer 500µl-Kolbenhubpipette 0,5 ml ACH-Standardlösungen in der jeweiligen Konzentration mit 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung, die 0,02 µg Isopropanol/ml enthielt, versetzt, bei 37° C 45 min., bei 55° C 20 min. equilibriert und danach analysiert.

Aus den so für jede Konzentration ermittelten Eichfaktoren $f_1 - f_4$ wurde der Mittelwert $\bar{f}$ errechnet, der nun als konstanter Eichfaktor im angegebenen Konzentrationsbereich verwendet werden konnte.

Die Abweichung der Einzelfaktoren $f_1 - f_4$ vom Mittelwert $\bar{f}$ war dabei meist kleiner als 3 %; niemals größer als 5 %.

3.5 Berechnung des ACH-Gehalts in den Proben

In den Probenansätzen waren die Erythrocytensuspensionen nach Bestimmung des Ausgangs-Hb-Gehaltes mit 145 mM NaCl 10 mM Tris/HCl-Pufferlösung pH 7,4, die Hämolysate mit 15 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,4 auf einen Hb-Gehalt von 6 g Hb/100 ml eingestellt.

Das Vollblut wurde im nativen Zustand, also ohne den ursprünglichen Hb-Wert zu verändern, in den Probenansatz gegeben. Der Hb-Gehalt lag dabei zwischen 14,5 g % bei Proband C und 15,4 g % bei Proband B. Der berechnete ACH-Gehalt in den hämoglobinhaltigen Proben wurde nach Bestimmung des Hb-Gehaltes in der Probe auf 1 mg Hb bezogen.

Da eine entsprechende Bezugsgröße im Plasma fehlt, wurde hier der ACH-Gehalt in mM ACH/l Plasma angegeben.

Mit Hilfe des ermittelten Eichfaktors $\bar{f}$ kann in den Probenansätzen aus der Peak-Fläche des ACH und des inneren Standards Isopropanol die Konzentration des ACH nach folgender Formel (vgl. Gleichung 3) berechnet werden.

Gleichung 3:

$$\frac{F(\text{ACH})}{F(\text{Isopropanol})} \cdot \bar{f} = C(\text{ACH})$$

4. Bestimmung des Hb-Gehaltes mit der photometrischen Cyan-Met-Hb-Methode

4.1 Prinzip der Methode

Die Hb-Bestimmung der Proben erfolgt mit dem Reagenz der Fa. ASID (Cyanhämglobinreagenz). Das gebrauchsfertige Reagenz wird hergestellt, indem der Inhalt eines Fläschchens der konfektionierten Trockensubstanz mit Aqua bidestillata in einen 1000 ml Kolben gespült und zur entsprechenden Marke aufgefüllt wird. Das Cyanhämglobinreagenz enthält

Kaliumhexacyanoferrat (III)	0,607 mmol/l
Kaliumcyanid	0,767 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	11,9 mmol/l.

Das Kaliumhexacyanoferrat oxydiert Hämoglobin zu Hämglobin welches mit Kaliumcyanid einen stabilen Hämglobin-cyanid-Komplex bildet, (Cyan-Met-Hb), dessen Extinktion photometrisch bestimmt werden kann.

4.2 Probenansatz

Zu 5 ml Cyanhämglobinreagenz pipettiert man 20 µl Probe mittels einer Einmalmikropipette. Nach ca. 20 Minuten und mehrmaligem Schütteln kann die Messung vorgenommen werden.

4.3 Die Messung

Diese wurde ohne Standardlösung mit einem Spektralphotometer der Fa. Beckmann, Modell 24 bei einer Wellenlänge von 540 nm durchgeführt. Die Proben wurden gegen den Leerwert des Cyanhämoglobinreagenz gemessen. Für die Berechnung des Hb-Gehalts ohne Standard gilt die Formel:

$$\text{Hb (g/100 ml)} = \text{Extinktion (Probe)} \cdot 36,8$$

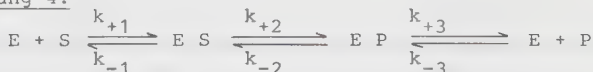
Von jeder Blut- bzw. Erythrocyten- und Hämolsat-Probe wurde eine 3-fache Bestimmung durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

5. Berechnung der enzymkinetischen Parameter $V_{\max}$ (max. Geschwindigkeit) und k_m (Michaelis-Konstante)

5.1 $V_{\max}$ - und k_m -Berechnungen nach Michaelis und Menten sowie Lineweaver und Burk

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion ist bei definierter Temperatur und definiertem pH allgemein abhängig von der Konzentration an Enzymen $[E]$, Substrat $[S]$ und Produkt $[P]$, sowie von der Konzentration an oxydiertem und reduziertem Cosubstrat.

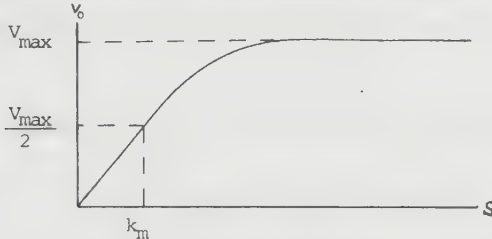
Gleichung 4:



Die Reaktion verläuft dabei über die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes ES, aus dem heraus die Bildung des Produktes P erfolgt, (vgl. Gleichung 4). Damit die mit den Geschwindigkeit-Konstanten k_{-1} , k_{-2} , k_{-3} bezeichneten Rückreaktionen vernachlässigbar sind, verwendet man für kinetische Untersuchungen mit dem Photometer nur die jeweiligen Anfangsgeschwindigkeiten v_o der Reaktion und trägt diese bei verschiedenen Substratkonzentrationen $[S]$ enthaltenen Anfangsgeschwindigkeiten v_o gegen die entsprechende Substratkonzentration auf. Dabei erhält man das auf Abb. 1 gezeigte Diagramm mit den, ein Enzym charakterisierenden, Größen $V_{\max}$ und k_m .

Dieses Diagramm spiegelt die maximale Substratumsatz-Geschwindigkeit bei den jeweiligen Substratkonzentrationen wieder.

Abb. 1: Prinzipieller Verlauf einer Enzymsättigungskurve.



Die Substratkonzentration, bei welcher die halbe max. Geschwindigkeit $\frac{v_{\max}}{2}$ erreicht ist, wird als Michaelis-Konstante k_m bezeichnet. $v_{\max}$ und k_m sind diejenigen Größen, die ein Enzym eindeutig charakterisieren.

Zur graphischen Ermittlung von k_m bedient man sich der Methode nach Lineweaver und Burk, bei welcher man die Substratkonzentration $[S]$ und die Anfangsgeschwindigkeit v_0 reziprok gegeneinander in ein Koordinatensystem aufträgt (Abb. 2).

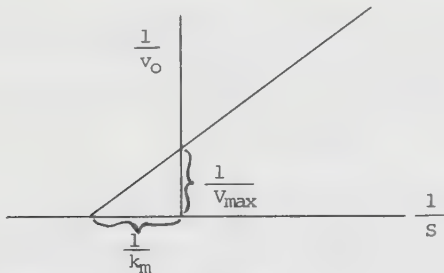


Abb. 2: Lineweaver-Burk-Diagramm

Hierbei erhält man eine Gerade der Steilheit $k_m/v_{\max}$, welche die Ordinate bei $1/v_{\max}$ schneidet und k_m im Abszissenschnittpunkt als $-\frac{1}{k_m} = -\frac{1}{[S]}$ erhalten wird.

Bei den von uns verwendeten ACH-Bestimmungsmethoden A und B ist es nicht möglich, die Anfangsgeschwindigkeit v_o zu ermitteln; deshalb können die genannten Bedingungen von Michaelis und Menten nur modifiziert angewendet werden.

Bedingt durch die unterschiedlichen ACH-Bestimmungsmethoden unterscheiden sich auch die Berechnungen von V_{max} und k_m bei Methode A und Methode B.

5.2 k_m - und V_{max} -Berechnungen bei Bestimmungsmethode A

Bei der Methode A nach INOUE et al. (10) wird anstatt der Anfangsgeschwindigkeit v_o die Substratumsatz-Geschwindigkeit v in die Diagramme der Abb. 1 und Abb. 2 eingesetzt. Diese wird dadurch erhalten, daß man den ACH 1 Stunde lang in der Probe inkubiert und dann nach Reaktionsabbruch den verbleibenden ACH im Überstand bestimmt. Die Substratumsatz-Geschwindigkeit v wird in nM ACH Abnahme/mg Hb/h ausgedrückt und zur Bestimmung von V_{max} und k_m der jeweiligen ACH-Ausgangskonzentration analog der Abb. 1 und Abb. 2 zugeordnet.

5.3 k_m - und V_{max} -Berechnungen bei Bestimmungsmethode B

Bei der Methode B wird eine gewisse Anzahl von gleichen Ansätzen gleichzeitig inkubiert und in den Proben nach verschiedenen Zeitabständen der ACH-Gehalt bestimmt.

Dadurch ist es möglich, die ACH-Abnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit darzustellen.

Durch Ermittlung der Steilheit an verschiedenen Punkten der ACH-Abnahmekurve kann man nun jeder ACH-Konzentration die aktuelle Abnahmegeschwindigkeit v zuordnen und diese als nM ACH-Abnahme/mg Hb/h ausdrücken.

Mit der ermittelten ACH-Abnahmegeschwindigkeit v bei der jeweiligen ACH-Konzentration $[S]$ ist es möglich, die enzymkinetischen Parameter V_{max} und k_m analog der Abb. 1 und Abb. 2 zu ermitteln.

Zusätzlich zur Bestimmung der Geschwindigkeit v aus der ACH-Abnahmekurve wurde, wie bei der Methode A, auf v direkt geschlossen, indem der ACH 1 Stunde lang in der Probe inkubiert und anschließend die verbliebene ACH-Menge im Ansatz bestimmt wurde.

Die Substratumsatz-Geschwindigkeit wird dann direkt als nM ACH-Abnahme/mg Hb/h ausgedrückt und gegen die jeweiligen ACH-Ausgangskonzentrationen analog der Abb. 1 und Abb. 2 aufgetragen.

Diese Berechnungsmethode für $V_{\max}$ und k_m wurde unter Verwendung der ACH-Bestimmungsmethode B zusätzlich nur bei den Erythrocytensuspensionen durchgeführt.

6. Versuchsbeschreibungen

6.1 Versuche mit menschlichem Vollblut

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden mit der Kolbenhubpipette je 0,5 ml heparinisiertes Vollblut mit 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung, die 0,02 μ g Isopropanol/ml als inneren Standard und Acetaldehyd (ACH) in 2 mM-Konzentration enthielt, versetzt.

10 solcher Ansätze wurden gleichzeitig in das 37° C warme Wasserbad des automatischen Probenwechslers eingesetzt, genau 45 min. inkubiert, bis im ersten dieser Ansätze gaschromatographisch die ACH-Konzentration bestimmt wurde. Jede weitere Probe wurde dann im zeitlichen Abstand von 30 min. fortlaufend analysiert, so daß zwischen Beginn der Inkubation und den letzten Proben mehr als 5 Stunden Abstand waren. Auf diese Weise konnte in den Blutproben die ACH-Abnahme vom Ausgangswert in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht werden und ein entsprechendes Konzentrations-Zeit-Diagramm erstellt werden.

6.2 Versuche mit menschlichem Plasma

Unmittelbar nach Abtrennen vom Probanden-Vollblut mittels einer Laborzentrifuge wurden je 0,5 ml Plasma, ohne weitere Bearbeitung, mit 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung, die ACH und inneren Standard Isopropanol enthielt, in ein Analysengefäß gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation der versiegelten Proben bei 37° C wurde der freie, nicht gebundene ACH in der Probe bestimmt. Den Proben waren ACH in 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM und 2 mM-Konzentrationen zugegeben worden.

6.3 Versuche mit menschlichen Erythrocyten

6.3.1 ACH-Bestimmungsmethode A

Jeweils 2 ml Erythrocytenlösung wurden in einem verschraubbaren Reagenzglas mit im Deckel eingelegter Gummidichtung mit 2 ml physiologischer NaCl-Lösung versetzt, in der sich 0,02 µg Isopropanol/ml und ACH (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM und 2 mM) befanden. Nachdem diese Ansätze 1 Stunde lang bei 37° C im Wasserbad inkubiert worden waren, wurde die enzymatische Reaktion gestoppt, indem die Probe sofort im Eiswasser abgekühlt und in der Laborzentrifuge abzentrifugiert wurde. In 1 ml des Überstandes wurde der ACH-Gehalt gaschromatographisch bei 55° C Equilibrierungstemperatur bestimmt und die Änderung des ACH-Gehaltes gemessen.

6.3.2 ACH-Bestimmungsmethode B

a) in intakten Erythrocyten

Um den ACH-Umsatz gewaschener Erythrocyten in Abhängigkeit von der Zeit untersuchen zu können, wurden je nach Menge des vorhandenen Erythrocytenmaterials 10-15 gleiche Proben (0,5 ml Erythrocytensuspension + 0,5 ml physiologischer NaCl, die Isopropanol und 2 mM ACH enthält) gleichzeitig in den Probenwechsler eingesetzt, bei 37° C 45 min. inkubiert und dann fortlaufend gaschromatographisch analysiert, wobei der zeitliche Probenabstand so gewählt wurde, daß die ACH-Abnahme über einen Zeitraum von 5 Stunden beobachtet werden konnte.

In einem Zusatzversuch wurden je 0,5 ml Erythrocytensuspensionen mit 4 Konzentrationen von ACH (0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM), die sich zusammen mit dem inneren Standard in 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung befanden, versetzt. Nach genau 60 min. Inkubation im 37° C warmen Wasserbad des automatischen Probenwechslers wurde der verbleibende freie ACH gaschromatographisch im Ansatz bestimmt.

b) in hitzedenaturierten Erythrocyten

Derselbe Versuch wurde mit hitzedenaturierten Erythrocyten durchgeführt. Hierzu wurden 0,5 ml Erythrocytensuspensionen im versiegelten Ansatzgefäß 60 min. ins 60° C warme Wasserbad gestellt, danach im Eiswasser abgekühlt und nach Öffnen des Gefäßes mit 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung, die inneren Standard und 2 mM ACH enthielt, versetzt. 10-15 solcher Ansätze wurden nach 45 min. Inkubation bei 37° C über einen Zeitraum von 5 Stunden fortlaufend analysiert und ein Konzentrations-Zeit-Diagramm erstellt.

6.4 Versuche mit Hämolysat menschlicher Erythrocyten

6.4.1 ACH-Bestimmungsmethode A im dialysierten Hämolysat

a) ohne NAD-Zusatz

1 ml des stromafreien, dialysierten Hämolysats wurde mit 1 ml NaCl-Lösung, die den Acetaldehyd (ACH) in Konzentrationen von 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM und Isopropanol als inneren Standard enthielt, in ein verschraubbares Reagenzglas mit im Deckel eingelegter Gummidichtung gegeben, 1 Stunde lang bei 37° C im Wasserbad inkubiert und danach im Eiswasser abgekühlt. Die Proben wurden dann schnell durch Zugabe von gleichen Teilen eiskalter 12 % Perchlorsäure deproteinisiert. Um Blasenbildungen und Inhomogenitäten beim Enteiweißungsprozeß zu vermeiden, wurde die Probe zuerst vorsichtig mit Perchlorsäure unterschichtet und dann mit dem Analysenmixer nach Verschuß des Reagenzglases homogen mit der Säure vermischt.

Das koagulierte Eiweiß wurde danach sofort abzentrifugiert. Vom Überstand, der den verbliebenen ACH und den inneren Standard Isopropanol enthielt, wurde 1 ml in das Analysengefäß gegeben, und dieses sofort versiegelt. Nach einer Equilibrierungszeit von 20 min. bei 55° C wurde der verbliebene ACH, bestimmt.

b) mit NAD-Zusatz

1 ml des stromafreien, dialysierten Hämolysats wurde mit 1 ml NaCl-Lösung, die ACH, Isopropanol und 1 mM NAD enthielt, in ein verschraubbares Reagenzglas gegeben und wie unter a) beschrieben, inkubiert, deproteinisiert und analysiert.

6.4.2 ACH-Bestimmungsmethode B im dialysierten Hämolysat

a) ohne NAD-Zusatz

Jeweils 10 gleiche Ansätze wurden in das 37° C warme Wasserbad des automatischen Probenwechslers eingesetzt, 45 min. lang inkubiert und dann nacheinander fortlaufend analysiert, wobei der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Proben so gewählt wurde, daß zwischen dem Einsetzen der Proben in das Wasserbad bis zur Analyse der letzten Probe 250 min. lagen.

Der Ansatz bestand aus 0,5 ml dialysiertem Hämolysat und 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung, die ACH in 2 mM Konzentration und Isopropanol als inneren Standard enthielt.

b) mit NAD-Zusatz

Derselbe Versuch, wie unter a) beschrieben, wurde durchgeführt mit dem Unterschied, daß sich in der physiologischen NaCl-Lösung neben ACH in 2 mM Konzentration und Isopropanol auch NAD in 1 mM Konzentration befand.

6.4.3 ACH-Bestimmungsmethode B im hitzedenaturierten Hämolysat

a) ohne NAD-Zusatz

Die Probandenhämolysate D und E wurden 1 Stunde lang bei 60° C hitzebehandelt. Je 0,5 ml davon wurden dann nach Abkühlung im Eiswasser mit 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung, die 2 mM ACH und inneren Standard Isopropanol enthielt, versetzt.

10 solche Ansätze wurden bei 37° C Equilibrierungstemperatur fortlaufend über einen Zeitraum von 5 Stunden analysiert.

b) mit NAD-Zusatz

Derselbe Versuch, wie unter a) angegeben, wurde mit 1 mM NAD-Zusatz durchgeführt.

II. ERGEBNISSE

1. Verhalten des in vitro zugesetzten Acetaldehyds im menschlichen Vollblut

Orientierende Vorversuche haben gezeigt, daß Acetaldehyd (ACH) zugesetzt zu Vollblut, sehr schnell verschwindet.

Es wurden deshalb im Blut von 5 Probanden die Änderungen des ACH-Gehaltes in Abhängigkeit von der Inkubationszeit genauer untersucht. Nach Inkubation der frisch entnommenen Probanden-Blutproben mit 2 mM ACH bei 37° C wurde der ACH-Gehalt mit der Bestimmungsmethode B fortlaufend in der Probe ermittelt. Dabei zeigte sich, wie in Abb. 3 dargestellt ist, daß die ACH-Konzentration mit fallender Geschwindigkeit abnimmt, um sich asymptotisch einem Gleichgewichtswert zu nähern, der, wie orientierende Vorversuche gezeigt haben, von der ACH-Ausgangskonzentration abhängig ist. Der Gleichgewichtswert wurde bei diesem Versuch aus zeitlichen Gründen nicht erreicht. Der gestrichelte Anfangsteil der ACH-Abnahmekurve im, von uns willkürlich festgelegten, Mindestinkubationsintervall, in dem keine ACH-Messungen erfolgt sind, ist extrapoliert eingezeichnet. Die Werte zur Abb. 3 sind der Tab. 2 zu entnehmen.

Konzentration [nM/mg/Hb] Zeit [min]	A	B	C	D	E	$\bar{x} \pm s$
0	13,2	13,8	13,1	13,0	13,3	13,3 $\pm$ 0,31
45	9,4	9,9	9,3	9,0	9,8	9,5 $\pm$ 0,37
60	8,6	8,9	8,6	8,3	8,9	8,7 $\pm$ 0,25
90	7,2	7,6	7,2	6,9	7,7	7,3 $\pm$ 0,33
120	6,4	6,7	6,1	6,0	6,7	6,4 $\pm$ 0,33
150	5,4	5,8	5,2	5,0	5,8	5,4 $\pm$ 0,36
180	4,4	4,9	4,5	4,2	5,0	4,6 $\pm$ 0,34
210	3,8	4,1	3,9	3,4	4,2	3,9 $\pm$ 0,31
240	3,0	3,5	3,2	2,7	3,6	3,2 $\pm$ 0,37
270	2,4	2,7	2,6	2,0	2,8	2,5 $\pm$ 0,32
300	1,7	2,2	2,0	1,4	1,9	1,8 $\pm$ 0,31
330	1,1	1,6	1,5	1,0	1,6	1,4 $\pm$ 0,29
360	0,9	1,1	1,1	0,8	1,4	1,1 $\pm$ 0,23

Tab. 2:

ACH-Gehalt in nM/mg Hb im Vollblut der Probanden A - E in Abhängigkeit von von der Inkubationszeit. Die Mittelwerte $\bar{x} \pm s$ sind in Abb. 3 graphisch dargestellt.

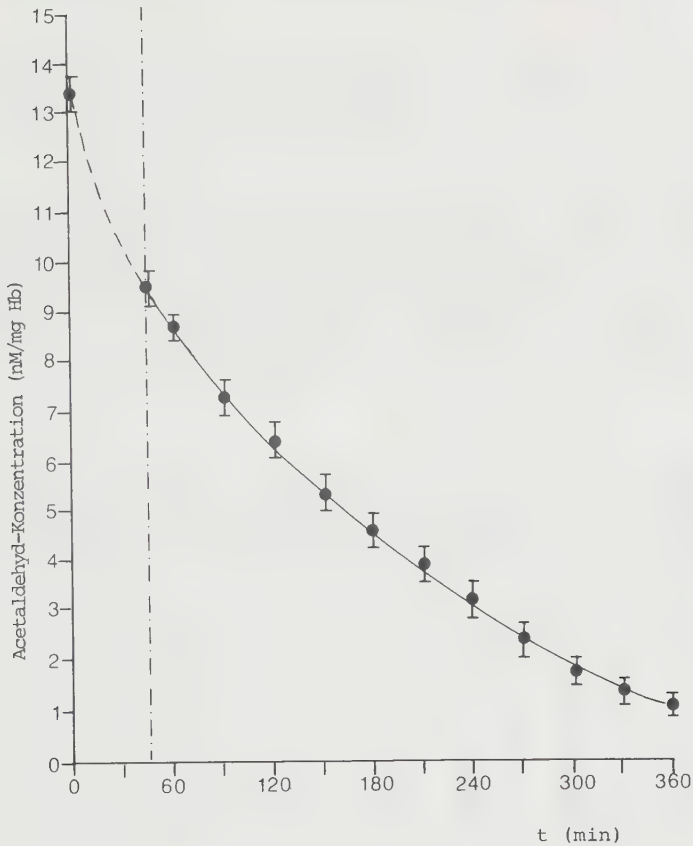


Abb. 3:

ACH-Abnahme im menschlichen Vollblut in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Das Vollblut wurde bei 37° C und physiologischem pH-Wert mit 2 mM ACH inkubiert. Der ACH-Gehalt wurde mit Methode B analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm s$ von 5 Probanden. Alle ACH-Konzentrationen sind in nM ACH/mg Hb ausgedrückt.

Als ein Maß, welches die ACH-Abnahme im Blut charakterisiert, wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 3 die Zeit ermittelt, nach der nur noch 50 % der ACH-Ausgangsmenge nachweisbar sind.

Wie in Abb. 4 zu sehen ist, sind nach $115,4 \pm 2,07$ min. bereits 50 % des ACH im Blut verschwunden, wobei die Einzelwerte zwischen 113 min. bei Proband A und 118 min. bei Proband E schwanken.

Nach 5 Stunden Inkubation sind, wie Abb. 5 zu entnehmen ist, nur noch $13,7 \pm 2,3$ % der ACH-Ausgangsmenge nachweisbar. Während dieser Inkubationszeit war das Blut in der Lage, $11,46 \pm 0,23$ nM ACH/mg Hb zum Verschwinden zu bringen (Abb. 6), wobei die Einzelwerte zwischen 11,1 nM ACH/mg Hb bei Proband C und 11,7 nM ACH/mg Hb bei Proband D schwanken.

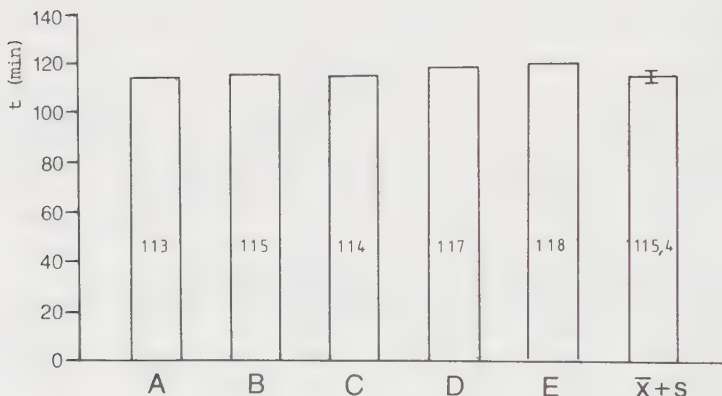


Abb. 4:

Halbwertszeit der ACH-Abnahme im menschlichen Vollblut, welches bei 37°C und physiologischem pH-Wert mit 2 mM ACH inkubiert wurde. Die ACH-Bestimmung erfolgte mittels Methode B. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

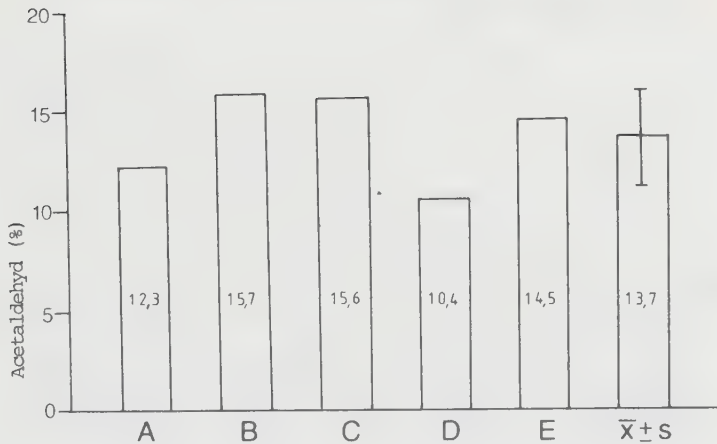


Abb. 5:

Prozentualer ACH-Gehalt im menschlichen Vollblut nach 5 h Inkubation mit 2 mM ACH bei 37° C und physiologischem pH-Wert. Der ACH-Gehalt wurde mittels Methode B ermittelt. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E, sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm 2$.

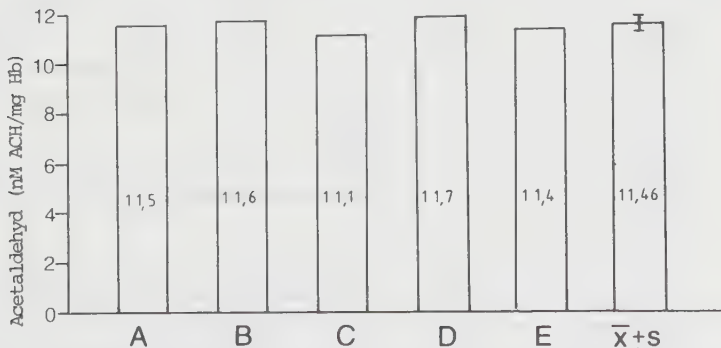


Abb. 6:

Absolute Menge der ACH-Abnahme im menschlichen Vollblut nach 5 h Inkubation mit 2 mM ACH bei 37° C und physiologischem pH-Wert. Die ACH-Bestimmung erfolgte mittels Methode B. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E, sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

2. Verhalten des in vitro zugesetzten Acetaldehyds im menschlichen Plasma

Der ACH-Gehalt im Plasma wurde mit der Bestimmungsmethode B ermittelt. Hierzu wurde frisch gewonnenes Spenderplasma mit Acetaldehyd (ACH) genau 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des ACH ohne Enteiweißung in der Probe. Wie sich in Vorversuchen gezeigt hat, nimmt der freie Acetaldehyd im menschlichen Plasma innerhalb des Inkubationszeitraumes um einen bestimmten Betrag ab und zeigt dann während der Analysenzeit keine weitere Konzentrationsminderung. Da somit die Kinetik der Bindung des ACH an die Plasmaproteine aus methodischen Gründen nicht erfassbar ist, haben wir uns lediglich auf die Untersuchung der konzentrationsabhängigen Abnahme des ACH im Plasma beschränkt. Dabei zeigt das Plasma ein typisches Sättigungsverhalten, d. h. bei Inkubation mit steigender ACH-Konzentration nimmt die absolute ACH-Abnahme zwar zu, die relative aber ab. Dieses Verhalten ist in Abb. 7 dargestellt.

Man erkennt, daß nach genau einer Stunde Inkubation mit 0,5 mM ACH $0,10 \pm 0,03$ mM ACH bzw. $19,7 \pm 5,7$ % der ACH-Ausgangsmenge verschwunden sind. Bei Inkubation mit 1 mM ACH nimmt der ACH-Gehalt um $0,17 \pm 0,04$ mM bzw. $17,2 \pm 4,10$ % ab. Setzt man 1,5 mM ACH dem Plasma zu, ist nach 1 Stunde ein ACH-Schwund von $0,24 \pm 0,06$ mM bzw. $16,0 \pm 4,5$ % nachweisbar.

Bei Zugabe von 2 mM ACH ist das Plasma in der Lage, $0,27 \pm 0,09$ mM ACH bzw. $13,6 \pm 4,6$ % der ACH-Ausgangsmenge zum Verschwinden zu bringen.

Aus den Werten der Abb. 7 ist ersichtlich, daß sich die Probandenplasmen zu ACH sehr ähnlich verhalten.

Lediglich bei Proband E liegt die Abbindungsfähigkeit des Plasmas bei etwa 50 % verglichen mit den übrigen Probanden.

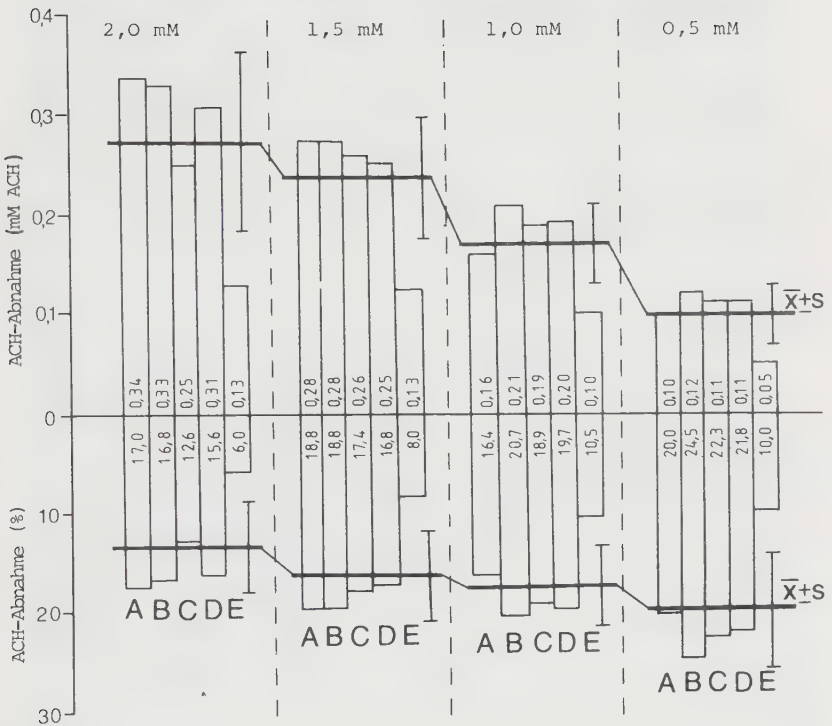


Abb. 7:

Absolute und prozentuale ACH-Abnahme im Plasma, welches mit verschiedenen ACH-Konzentrationen bei 37° C und physiologischem pH-Wert inkubiert wurde. Nach genau 1 h Inkubation erfolgte die ACH-Bestimmung mittels Methode B. Dargestellt sind die Werte der Probanden A - E, sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

3. Verhalten des in vitro zugesetzten Acetaldehyds in menschlichen Erythrocyten

Mit der Bestimmungsmethode B wurde die ACH-Abnahme fortlaufend in auf pH 7,4 eingestellten Erythrocytensuspensionen ermittelt, die einerseits gewaschene intakte Erythrocyten, andererseits gewaschene, aber bei 60° C 1 Stunde lang hitzedenaturierte Erythrocyten enthielten. Die dabei erhaltene Zeitabhängigkeit ist in Abb. 8 gezeigt.

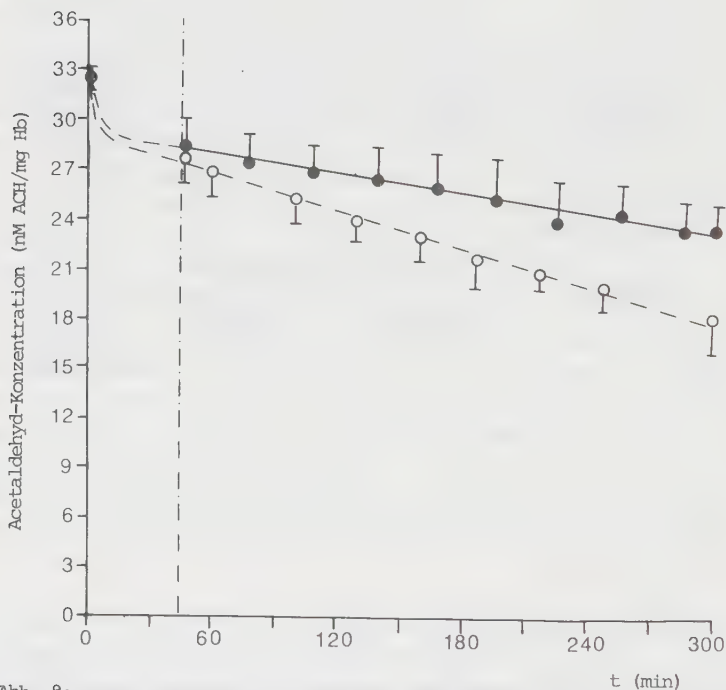


Abb. 8:

ACH-Abnahme in Suspensionen gewaschener intakter (O - - O) und hitzedenaturierter (● — ●) Erythrocyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Erythrocytensuspensionen wurden bei 37° C und pH 7,4 mit 2 mM ACH inkubiert und der ACH-Gehalt fortlaufend mit Methode B bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm s$ von 5 Probanden.

Man erkennt bei beiden Ansätzen einen linearen, d. h. maximal schnellen, ACH-Abfall, der allerdings bei den intakten Erythrocyten mit $2,1 \pm 0,52$ nM ACH/mg Hb/h erheblich größer ist als bei den hitzedenaturierten Erythrocyten, wo die maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeit lediglich $1,0 \pm 0,4$ nM ACH/mg Hb/h beträgt.

Wie der Abb. 9 zu entnehmen ist, weisen die Einzelwerte dabei erhebliche Unterschiede auf. So liegen die maximalen Abnahmegeschwindigkeiten in den intakten Erythrocyten zwischen 1,5 nM ACH/mg Hb/h bei Proband C und 2,7 nM ACH/mg Hb/h bei Proband A, während sie in den Suspensionen mit hitzedenaturierten Erythrocyten zwischen 0,4 nM ACH/mg Hb/h bei Proband D und 1,5 nM ACH/mg Hb/h bei Proband B liegen.

Im gestrichelt gezeichneten, dem von uns willkürlich festgelegten Mindestinkubationszeitraum entsprechenden Anfangsteil der Kurve (Abb. 8), in dem der ACH nicht gemessen wird, wurde eine durchschnittliche Abnahmegeschwindigkeit formuliert, die aus der Differenz der ACH-Ausgangskonzentration von $32,7 \pm 0,73$ nM ACH/mg Hb und der ersten, nach genau 45 min. gemessenen Acetaldehydkonzentration berechnet wurde.

Es handelt sich dabei um einen Durchschnittswert, der keinen Schluß auf den wahren Kurvenverlauf zuläßt, welcher etwa wie in Abb. 8 extrapoliert dargestellt, verlaufen könnte.

Abb. 9 zeigt, daß in diesem 45-minütigen Inkubationszeitraum der ACH mit $7,1 \pm 0,57$ nM ACH/mg Hb/h bei den intakten Erythrocyten bzw. $5,7 \pm 1,22$ nM ACH/mg Hb/h bei den hitzedenaturierten Erythrocyten erheblich schneller abnimmt, als im gemessenen Kurventeil. Die Einzelwerte schwanken dabei in intakten Erythrocyten zwischen 6,2 nM ACH/mg Hb/h bei Proband B und 7,6 nM ACH/mg Hb/h bei Proband A sowie in hitzedenaturierten Erythrocyten zwischen 3,7 nM ACH/mg Hb/h bei Proband B und 6,8 nM ACH/mg Hb/h bei Proband E. Die ACH-Abnahme in den Erythrocyten-suspensionen wurde durch fortlaufende ACH-Bestimmung im Ansatz insgesamt 5 Stunden untersucht.

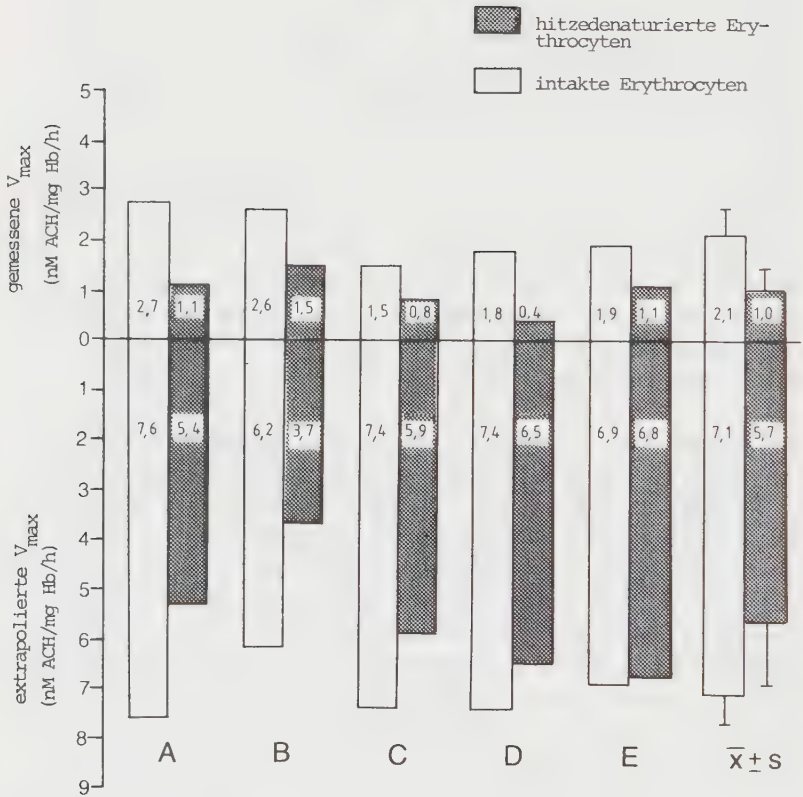


Abb. 9:

Mit Methode B bestimmte maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeiten $V_{\max}$ in Suspensionen intakter sowie hitzenaturierter Erythrocyten im gemessenen, sowie im analytisch nicht erfaßten, dem Mindestinkubationszeitraum entsprechenden Teil der ACH-Abnahmekurve von Abb. 8. Die Erythrocytensuspensionen wurden bei 37° C und pH 7,4 mit 2 mM ACH inkubiert. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

In dieser Zeit wurde der ACH, wie Abb. 10 zeigt, in den Suspensionen mit intakten Erythrocyten um $14,6 \pm 1,89$ nM ACH/mg Hb bzw. um $44,5 \pm 5,14$ % der ACH-Ausgangsmenge reduziert. In den hitzedenaturierten Erythrocyten nahm der ACH in derselben Zeit um $9,2 \pm 0,81$ nM ACH/mg Hb bzw. um $28,2 \pm 2,82$ % der Ausgangsmenge ab.

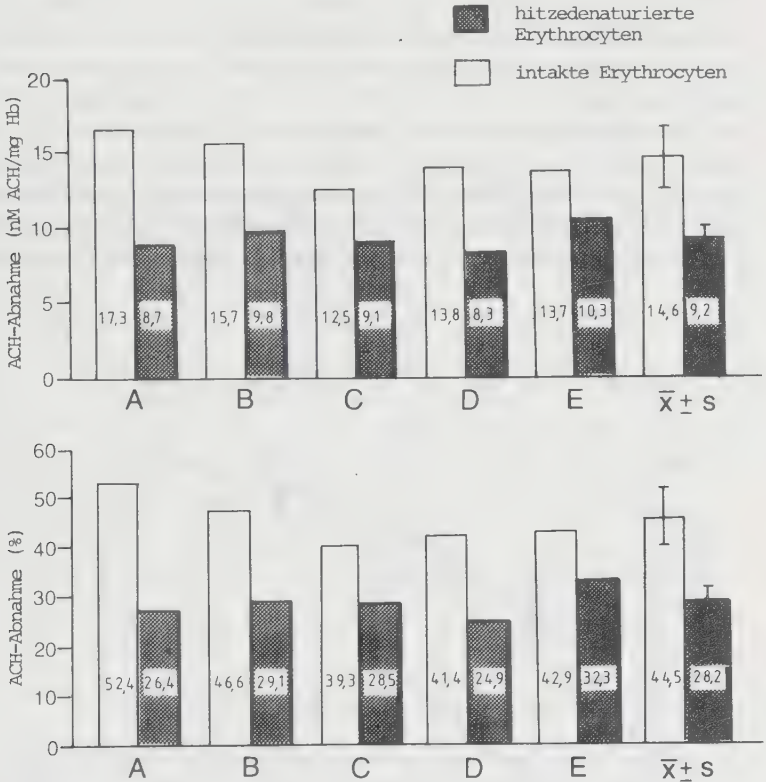


Abb. 10:

Mittels Methode B bestimmte absolute und prozentuale ACH-Abnahme in Suspensionen mit intakten und hitzedenaturierten menschlichen Erythrocyten nach 5 Stunden Inkubation mit 2 mM ACH bei 37° C und pH 7,4. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

Um das Verhalten des ACH in Erythrocytensuspensionen auch im niedrigen Substratkonzentrationsbereich zu beurteilen, wurden Suspensionen von intakten Erythrocyten bei pH 7,4 mit 2 mM, 1,5 mM, 1 mM und 0,5 mM ACH genau 1 Stunde bei 37° C inkubiert und der verbleibende ACH einerseits im Überstand durch die Bestimmungsmethode A, andererseits im Ansatz durch die Bestimmungsmethode B, bestimmt.

Aus der Differenz wird die ACH-Abnahmegeschwindigkeit v als nM ACH/mg Hb/h formuliert und der jeweiligen Ausgangskonzentration zugeordnet. Durch diese Versuchsanordnung, bei der der Methodenunterschied lediglich im Abzentrifugieren der Erythrocyten und der Equilibrierungstemperatur besteht, ist es möglich, die Genauigkeit der beiden Meßmethoden zu vergleichen. Die erhaltene Beziehung zwischen Substratkonzentration und der maximalen ACH-Abnahmegeschwindigkeit ist in Abb. 11 aufgezeigt.

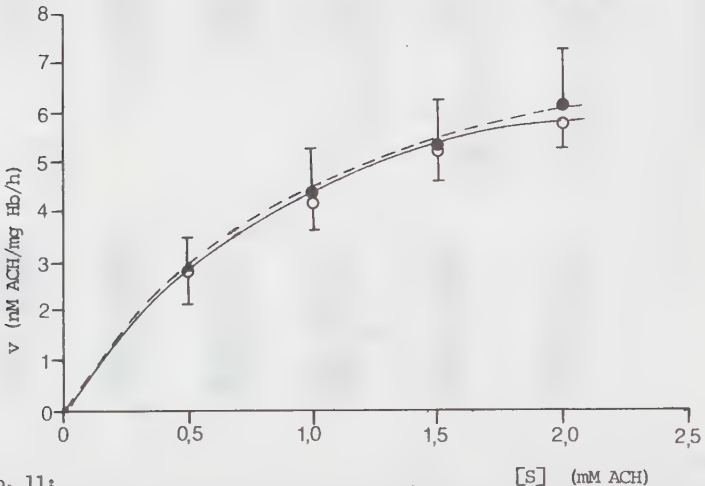


Abb. 11:

ACH-Abnahmegeschwindigkeit v in Suspensionen mit gewaschenen intakten Erythrocyten in Abhängigkeit von der inkubierten Substratkonzentration $[S]$. Die ACH-Bestimmung erfolgte nach genau 1 h Inkubation mit verschiedenen ACH-Mengen, einerseits mit Methode A (● - ●) im Probenüberstand, andererseits mit Methode B (○ - ○) im Probenansatz. Dargestellt sind Mittelwert $\bar{x} \pm s$ von 5 Probanden.

Man erkennt, daß die mittlere ACH-Abnahmegeschwindigkeit bei beiden Bestimmungsmethoden zunächst proportional zur Substratkonzentration linear zunimmt, um sich dann asymptotisch der max. Geschwindigkeit zu nähern, die bei einer Substratkonzentration von ca. 2 mM ACH erreicht wird.

Die ermittelte maximale Geschwindigkeit $V_{\max}$ unterscheidet sich bei beiden Methoden nur geringfügig.

Sie beträgt bei der ACH-Bestimmungsmethode A, wie sie von INOUE et al. (10) beschrieben wird, $6,3 \pm 0,91$ nM ACH/mg Hb/h wobei die Einzelwerte zwischen 5,5 und 7,5 nM ACH/mg Hb/h streuen (vgl. Abb. 13).

Demgegenüber ergibt sich, wie in Abb. 13 zu sehen ist, bei der ACH-Bestimmungsmethode B eine max. Geschwindigkeit von $6,1 \pm 0,27$ nM ACH/mg Hb/h, wobei die Einzelwerte zwischen 6,0 und 6,5 nM ACH/mg Hb/h schwanken.

Die Meßwerte zur Abb. 11 und Abb. 12 sind in der Tab. 3 aufgeführt.

$\frac{v}{\text{Konz.}}$	A	B	C	D	E	$\bar{x} \pm s$
2 mM	5,7 (7,2)	5,0 (6,1)	5,4 (5,1)	5,6 (5,1)	6,0 (7,2)	$5,6 \pm 0,37$ $(6,1 \pm 1,05)$
1,5 mM	4,5 (6,0)	5,4 (4,7)	5,4 (4,6)	5,5 (5,1)	5,0 (6,2)	$5,2 \pm 0,42$ $(5,3 \pm 0,74)$
1,0 mM	3,8 (5,4)	4,6 (4,2)	3,9 (3,6)	4,1 (3,9)	3,6 (4,6)	$4,0 \pm 0,38$ $(4,3 \pm 0,70)$
0,5 mM	3,4 (3,8)	2,5 (2,2)	2,7 (2,4)	3,1 (2,7)	2,1 (2,9)	$2,8 \pm 0,51$ $(2,8 \pm 0,62)$

Tab. 3:

Ergebnisse der mittels Methode A (in Klammern) und Methode B bestimmten ACH-Abnahmegeschwindigkeit v in Suspensionen mit gewaschenen intakten Erythrocyten bei der jeweiligen ACH-Ausgangskonzentration. Die Erythrocyten der Probanden A - E wurden bei 37 ° C und pH 7,4 mit verschiedenen ACH-Mengen inkubiert. Nach genau 1 h wurde der verbliebene ACH mit Methode A im Probenüberstand und mit Methode B im Probenansatz bestimmt. Die Geschwindigkeit v ist in nM ACH/mg Hb/h angegeben.

Bei der reziproken Darstellung der Substratumsatzgeschwindigkeit v und der Substratkonzentration $[S]$ zeigt sich im Lineweaver-Burk-Diagramm (vgl. Abb. 12)' bei der Bestimmungsmethode A eine Michaelis-Konstante k_m für ACH von $0,52 \pm 0,07$ mM, bei einer Streuung der Einzelwerte zwischen $0,43$ und $0,62$ mM (vgl. Abb. 13). Wird die Bestimmungsmethode B benützt, so erhält man eine Michaelis-Konstante k_m für ACH von $0,57 \pm 0,14$ mM, wobei die Probandeneinzelwerte zwischen $0,45$ und $0,80$ mM liegen.

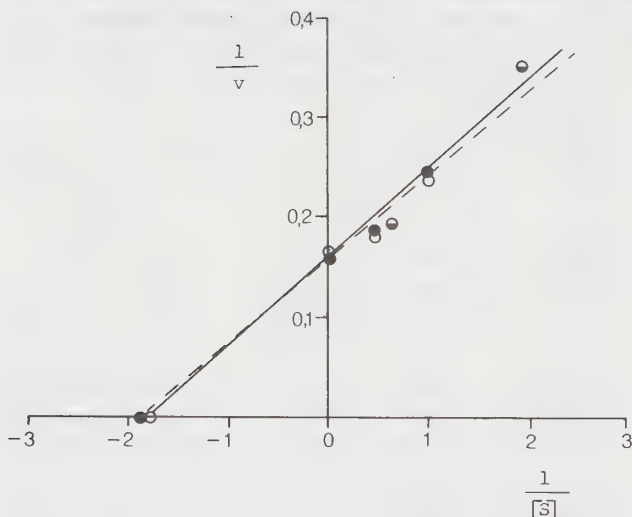


Abb. 12:

Reziproke Darstellung der Kurve aus Abb. 11 nach Lineweaver und Burk zur graphischen Bestimmung der Michaeliskonstante k_m für ACH. Dargestellt ist die Kurve der Mittelwerte der 5 Probanden A - E.

ACH-Bestimmung mittels Methode A: ● - - - ●

ACH-Bestimmung mittels Methode B: ○ ——— ○

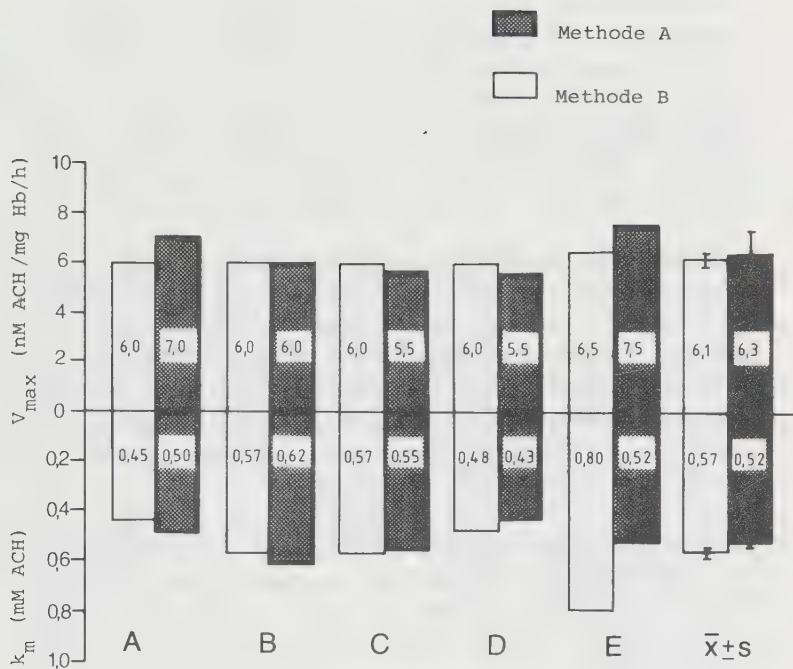


Abb. 13:

Maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeiten $V_{\max}$ sowie die jeweiligen K_m -Werte für ACH in Suspensionen mit gewaschenen menschlichen Erythrocyten. Die gewaschenen Erythrocyten wurden mit verschiedenen ACH-Mengen bei 37° C und pH 7,4 inkubiert und der verbleibende ACH mittels Methode A und mittels Methode B bestimmt. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$ (vgl. auch Abb. 11 und Abb. 12).

4. Verhalten des in vitro zugesetzten Acetaldehyds im Hämolysat menschlicher Erythrocyten

Im stromafreien, dialysierten, auf pH 7,4 eingestellten Hämolysat mit und ohne NAD-Zusatz wurde die Acetaldehyd-Abnahme durch fortlaufende ACH-Bestimmung im Ansatz mittels der Bestimmungsmethode B durchgeführt. Die Kurve in Abb. 14 zeigt, daß der Acetaldehyd (ACH) in beiden Ansätzen linear, d. h. maximal schnell, bis hin zu Konzentrationsbereichen abnimmt, die sicher unter 100 μ M ACH liegen.

Die ermittelte maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$ liegt beim Hämolysat ohne NAD-Zusatz bei $9,1 \pm 0,88$ nM ACH/mg Hb/h, wobei die Einzelwerte, wie der Abb. 15 zu entnehmen ist, zwischen 8,2 und 10,3 nM ACH/mg Hb/h schwanken. Ähnliches ergibt sich beim Hämolysat mit 1 mM NAD-Zusatz, wo eine maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeit von $8,7 \pm 1,34$ nM ACH/mg Hb/h ermittelt wird, wobei die Einzelwerte zwischen 6,7 und 10,3 nM ACH/mg Hb/h liegen (vgl. Abb. 15).

Nach $126,6 \pm 14,80$ min hat das Hämolysat ohne NAD-Zusatz 50 % der ACH-Ausgangsmenge zum Verschwinden gebracht. Für die gleiche Menge benötigte das Hämolysat mit NAD-Zusatz $133,4 \pm 16,73$ min. Dabei zeigen die Einzelwerte erhebliche Schwankungen.

Wie in Abb. 16 aufgezeigt ist, liegen die Halbwertszeiten im Hämolysat ohne NAD-Zusatz zwischen 115 min. bei Proband B und 152 min. bei Proband D.

Im Hämolysat mit NAD-Zusatz liegen die entsprechenden Werte ebenfalls zwischen 115 min. bei Proband B und 152 min. bei Proband D. Während dieser Zeit war das Hämolysat in der Lage, $17,3 \pm 1,30$ nM ACH/mg Hb zum Verschwinden zu bringen, wobei die Einzelwerte zwischen 16,7 und 18,1 nM ACH/mg Hb schwanken (vgl. Abb. 17).

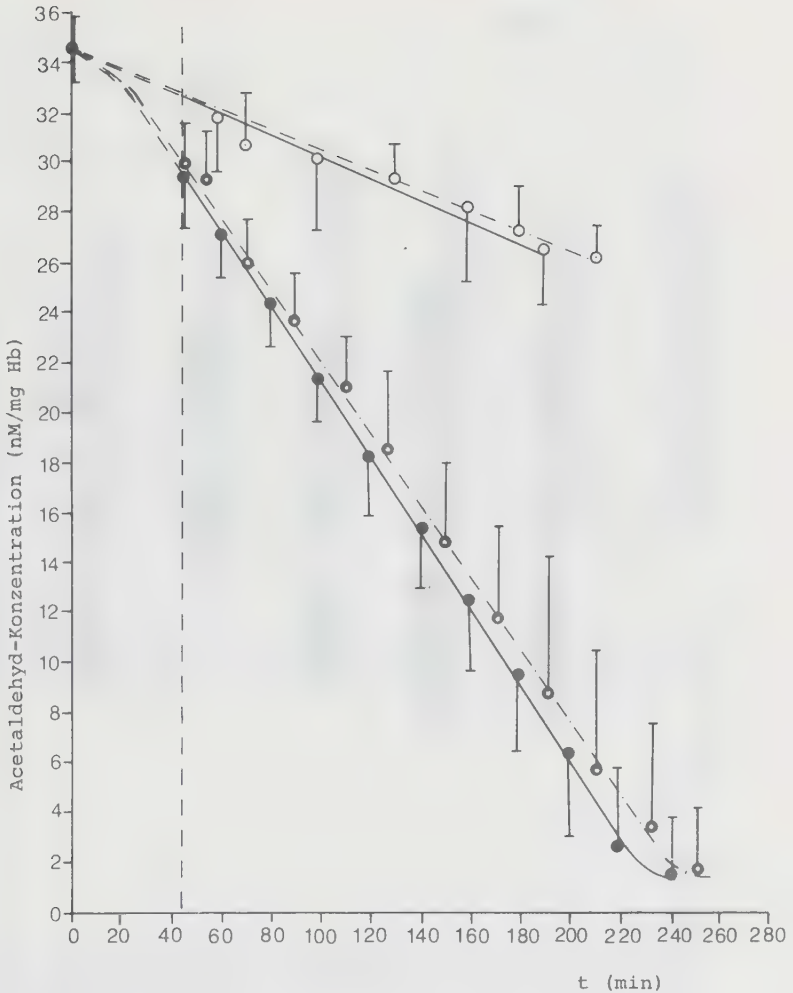


Abb. 14:

ACH-Abnahme im stromafreien dialysierten Hämolyat mit (●—●) und ohne (○---○) NAD-Zusatz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Das Hämolyat wurde bei 37° C und pH 7,4 mit 2 mM ACH inkubiert und der ACH fortlaufend mittels Methode B im Ansatz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm s$ von 5 Probanden. Demgegenüber nimmt der ACH im hitzedenaturierten Hämolyat mit (○---○) und ohne (●—●) NAD-Zusatz unter sonst gleichen Bedingungen wesentlich langsamer ab. Die ACH-Abnahme wurde nur in den hitzedenaturierten Hämolyaten der Probanden D und E bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm s$ der zwei Probanden. Alle ACH-Konzentrationen sind in nM ACH/mg Hb ausgedrückt.

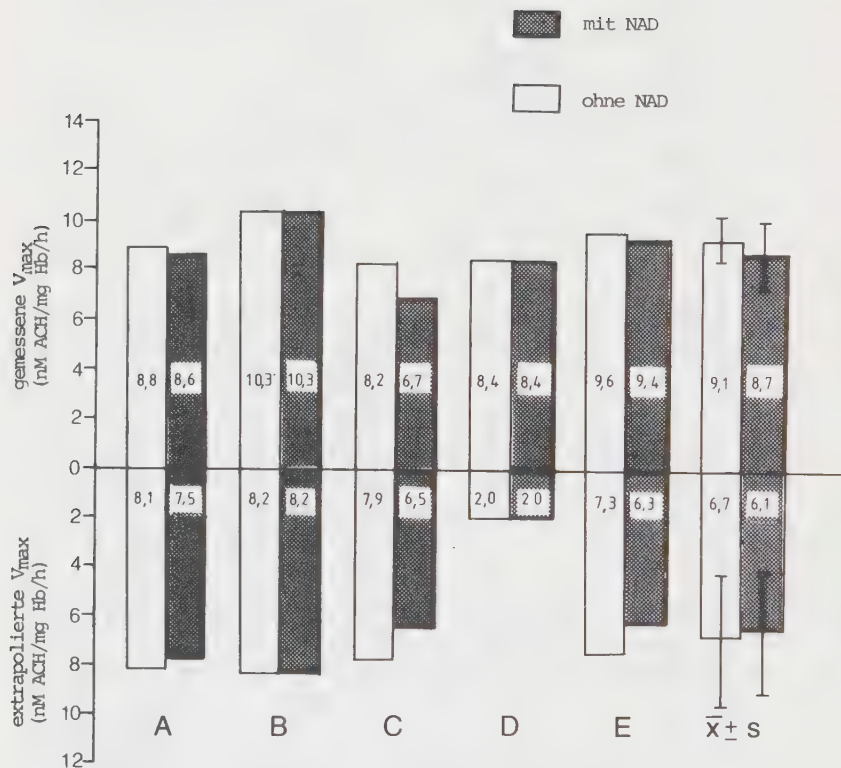


Abb. 15:

Mittels Methode B bestimmte maximale ACh-Abnahmegeschwindigkeiten V_{max} im stromafreien dialysierten Hämolsat mit und ohne NAD-Zusatz, einerseits im gemessenen, andererseits im analytisch nicht erfaßten Teil der ACh-Abnahmekurve von Abb. 14. Das Hämolsat wurde bei 37° C und pH 7,4 mit 2 mM ACh inkubiert. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

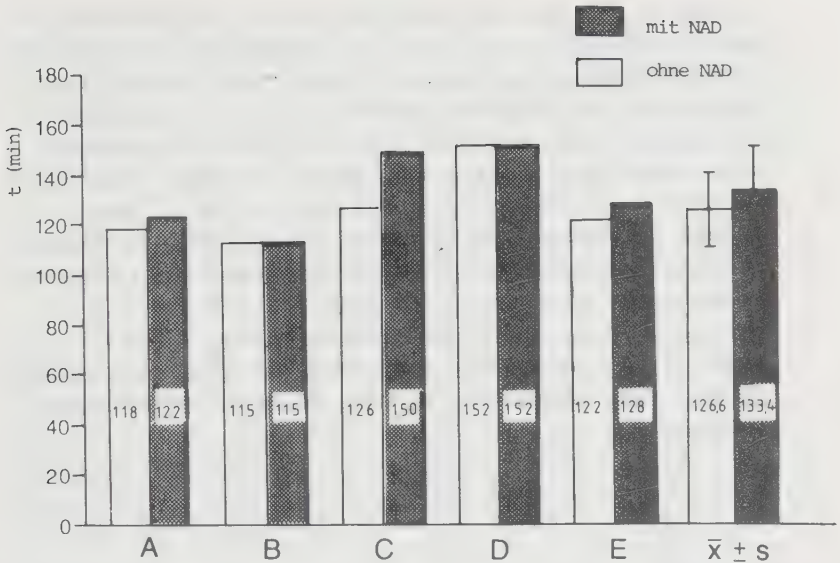


Abb. 16:

Halbwertszeiten der ACH-Abnahme im stromafreien dialysierten Hämolysat mit und ohne NAD-Zusatz. Das Hämolysat wurde bei 37° C und pH 7,4 mit 2 mM ACH inkubiert und der ACH mit Methode B bestimmt. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

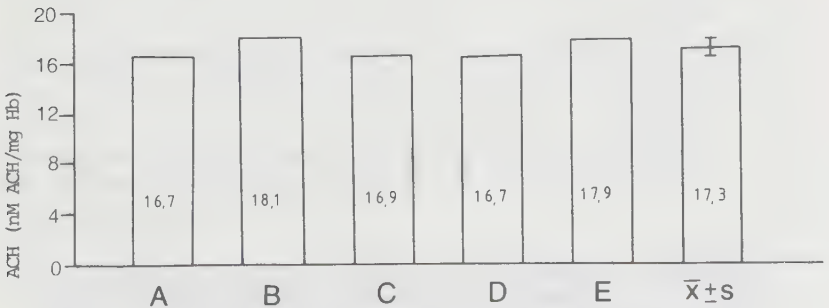


Abb. 17:

Absolute Menge der ACH-Abnahme im dialysierten Hämolysat mit und ohne NAD-Zusatz bei der Halbwertszeit (vgl. Abb. 16) bezogen auf 1 mg Hb. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

In Vorversuchen hat sich gezeigt, daß sich die ACH-Abnahme-kurve im Hämolytat (vgl. Abb. 14) asymptotisch einem gerade noch nachweisbaren Gleichgewichtswert nähert. Dieser flach auslaufende, in Konzentrationsbereichen unter $100 \mu\text{M}$ ACH liegende Kurventeil, konnte wegen der schnellen Abbaugeschwindigkeit einerseits, sowie wegen des relativ großen Probenabstandes andererseits, nicht genau ermittelt werden. Da aber der Übergang vom linearen zum gekrümmt verlaufenden Kurventeil, bei allen Probandenkurven eindeutig in ACH-Konzentrationsbereichen weit unter $100 \mu\text{M}$ liegt, kann, wie in Abb. 18 gezeigt, eine Michaelis-Konstante k_m von ca. $40\text{--}80 \mu\text{M}$ ACH, keinesfalls aber wesentlich höher, angenommen werden, sofern man einen typischen Enzymsättigungsverlauf voraussetzt.

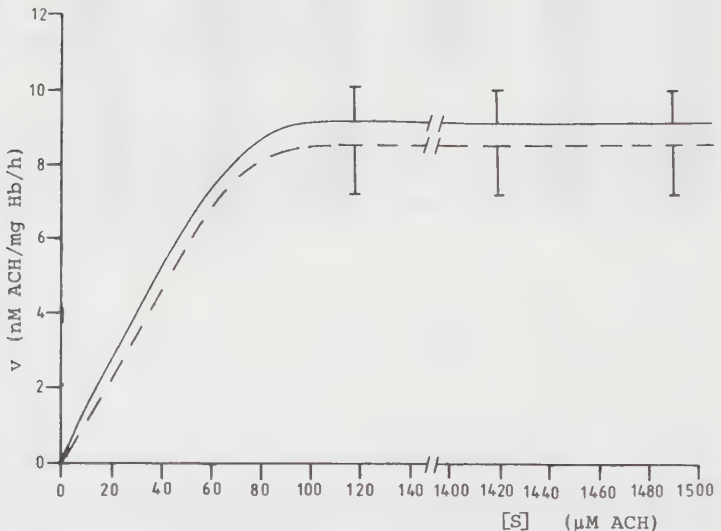


Abb. 18:

ACH-Abnahme-geschwindigkeit v im stromafreien dialysierten Hämolytat mit (---) und ohne (—) NAD-Zusatz in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$. Das Hämolytat wurde mit ACH bei 37°C und pH 7,4 inkubiert und der ACH mit Methode B bestimmt. Dargestellt ist die Kurve der Mittelwerte $\bar{x} + s$. Die Wertepaare wurden der Abb. 14 entnommen. Der Anfangsteil der Kurve ist bis zum linear verlaufenden Kurvenabschnitt extrapoliert eingezeichnet.

Im gestrichelten, extrapoliert eingezeichneten Anfangsteil der ACH-Abnahmekurve in Abb. 14, der dem Mindestinkubationszeitraum entspricht, wurde, wie beim analogen Erythrocytenversuch (vgl. S. 34) eine durchschnittliche Abnahmegeschwindigkeit aus der Differenz zwischen der ACH-Ausgangsmenge und der, nach genau 45 min. gemessenen Menge, formuliert.

In Abb. 15 ist gezeigt, daß in diesem 45-minütigen Inkubationszeitraum der ACH im Hämolysat ohne NAD-Zusatz mit $6,7 \pm 2,65$ nM ACH/mg Hb/h bzw. im Hämolysat mit NAD-Zusatz mit $6,1 \pm 2,42$ nM ACH/mg Hb/h deutlich langsamer abnimmt, als im gemessenen Kurventeil. Dieses Verhalten ist ausnahmslos bei allen Probandenhämolysaten zu beobachten, wobei besonders Proband D auffällt, dessen Erythrocytenhämolysat mit und ohne NAD-Zusatz den ACH im Inkubationszeitraum mit einer durchschnittlichen Abnahmegeschwindigkeit von nur 2,0 nM ACH/mg Hb/h zu reduzieren vermag.

Die Erythrocytenhämolysate der Probanden D und E sind 1 Stunde lang bei 60° C hitzedenaturiert worden. Die Abnahmegeschwindigkeit wurde danach durch fortlaufende ACH-Bestimmung im Ansatz mit der Bestimmungsmethode B ermittelt. Die in Abb. 14 eingezeichnete Abnahmekurve zeigt, daß der ACH mit $2,6 \pm 0,14$ nM ACH/mg Hb/h im hitzedenaturierten Hämolysat ohne NAD-Zusatz wesentlich langsamer abnimmt als im nicht hitzebehandelten. Die Einzelwerte liegen dabei, wie in Abb. 19 zu sehen ist, beim Probanden D bei 2,6 nM ACH-Abnahme/mg Hb/h, beim Probanden E bei 2,5 nM ACH-Abnahme/mg Hb/h.

Ähnliche Ergebnisse werden im hitzedenaturierten Hämolysat mit NAD-Zusatz erhalten, wo der ACH mit $2,4 \pm 0,14$ nM ACH/mg Hb/h abnimmt, wobei die entsprechenden Werte vom Proband D bei 2,3 nM ACH-Abnahme/mg Hb/h, vom Proband E bei 2,5 nM ACH-Abnahme/mg Hb/h liegen. Auffällig ist, daß die extrapolierte durchschnittliche ACH-Abnahmegeschwindigkeit im Inkubationszeitraum genauso groß ist, wie die ermittelte ACH-Abnahmegeschwindigkeit im gemessenen Kurvenabschnitt.

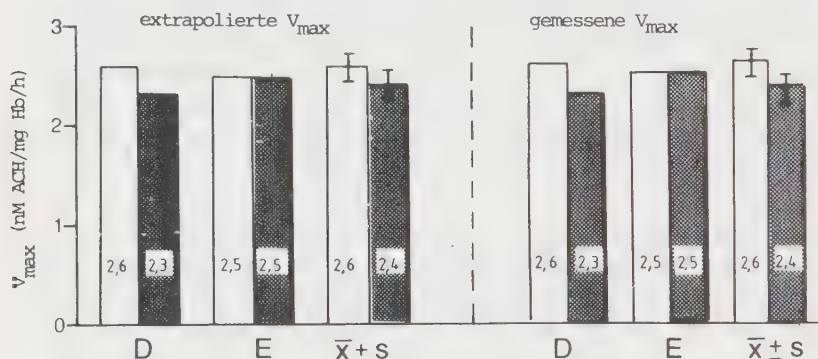


Abb. 19:

Maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeit V_{max} im stromafreien dialysierten aber hitzedenaturierten Hämolysat der Probanden D und E mit und ohne NAD-Zusatz. Das Hämolysat wurde bei 37°C und pH 7,4 mit 2 mM ACH inkubiert. Der ACH wurde mittels Methode B bestimmt (vgl. Abb. 14). Es ist die V_{max} im gemessenen Kurventeil der errechneten V_{max} im Mindestinkubationszeitraum gegenübergestellt.



mit NAD



ohne NAD

Ganz andere Ergebnisse für die max. Geschwindigkeit $V_{\max}$ und die Michaelis-Konstante k_m - als kinetische Parameter der ACH-Abnahme im Hämolytat - wurden mit der von INOUE et al. (10) beschriebenen ACH-Bestimmungsmethode A erhalten, bei welcher die ACH-Bestimmung nach Abbruch der Reaktion durch Enteiweißung mit 12 % Perchlorsäure im wässrigen Überstand erfolgt. Die ACH-Abnahmegeschwindigkeit v , die sich aus der Differenz der ACH-Ausgangsmenge und der nach genau 1 Stunde Inkubationsdauer ermittelten Menge ergibt, wird in Abb. 20 gegen die Substratkonzentration aufgetragen und $V_{\max}$ sowie k_m ermittelt.

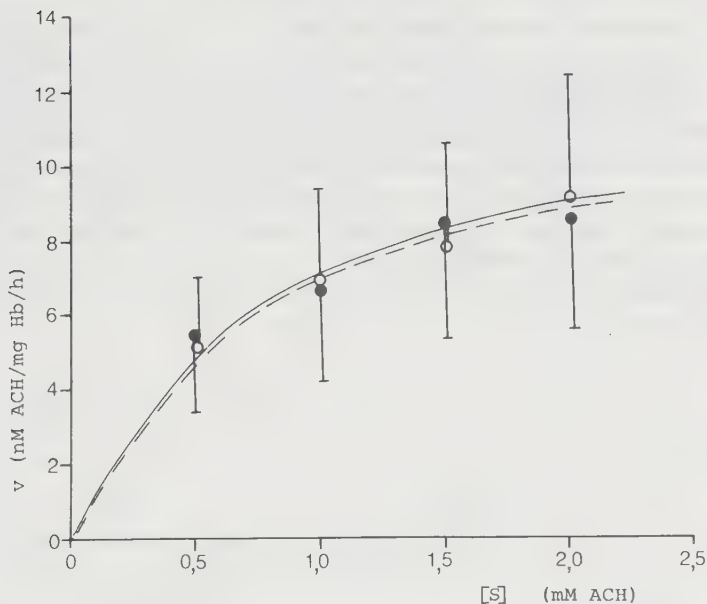


Abb. 20:

ACH-Abnahmegeschwindigkeit v im stromafreien dialysierten Hämolytat mit (● - ●) und ohne (○ - ○) NAD-Zusatz in Abhängigkeit von der inkubierten Substratkonzentration S . Die ACH-Bestimmung erfolgte nach genau 1 h Inkubation mit verschiedenen ACH-Mengen bei 37° C und pH 7,4 mit Methode A im enteiweißten Überstand der Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm s$ von 5 Probanden.

Man erkennt im Hämolysat mit und ohne NAD-Zusatz den typischen Verlauf einer Enzymsättigungskurve mit einer zunächst proportional zur Substratkonzentration $[S]$ ansteigenden ACH-Abnahmegeschwindigkeit, die sich dann mit steigender Substratkonzentration asymptotisch der max. Geschwindigkeit $V_{\max}$ nähert. Diese erreicht im Hämolysat ohne NAD-Zusatz $9,6 \pm 3,07$ nM ACH/mg Hb/h, wobei die Einzelwerte zwischen 4,5 nM ACH/mg Hb/h bei Proband D und 12,0 nM ACH/mg Hb/h bei Proband A und E liegen (vgl. Abb. 22). Entsprechend ergibt sich im Hämolysat mit 1 mM NAD-Zusatz eine max. Geschwindigkeit $V_{\max}$ von $9,6 \pm 2,90$ nM ACH/mg Hb/h, mit Einzelwerten, die, wie in Abb. 22 gezeigt ist, zwischen 5 nM ACH/mg Hb/h bei Proband D und 12,5 nM ACH/mg Hb/h bei Proband E liegen.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm in Abb. 21 wird als Michaelis-Konstante k_m für ACH im Hämolysat ohne NAD-Zusatz $0,45 \pm 0,21$ mM ermittelt. Die Einzelwerte liegen dabei zwischen 0,25 mM bei Proband D und 0,8 mM bei Proband A (vgl. Abb. 22). Wurde dem Hämolysat 1 mM NAD zugesetzt, so ergibt sich für das Substrat ACH der k_m -Wert von $0,45 \pm 0,22$ mM. Die in der Abb. 22 aufgezeigten Einzelwerte liegen dabei zwischen 0,29 mM bei Proband D und 0,8 mM bei Proband A.

Die Werte zur Abb. 20 und Abb. 21 sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Konz.	v					
	A	B	C	D	E	$\bar{x} \pm s$
2 mM	11,9 (11,3)	9,4 (7,1)	8,7 (9,7)	4,2 (4,3)	11,5 (10,5)	$9,1 \pm 2,70$ $(8,6 \pm 2,87)$
1,5 mM	6,6 (6,8)	7,1 (8,7)	9,1 (10,2)	4,3 (4,5)	11,4 (12,4)	$7,7 \pm 2,68$ $(8,5 \pm 3,05)$
1,0 mM	6,9 (6,7)	6,2 (6,2)	7,9 (6,2)	3,4 (4,0)	9,9 (10,6)	$6,9 \pm 2,38$ $(6,7 \pm 2,40)$
0,5 mM	4,4 (4,4)	6,0 (6,3)	5,6 (5,3)	3,2 (3,4)	8,0 (8,5)	$5,4 \pm 1,80$ $(5,6 \pm 1,96)$

Tab. 4:

Meßergebnisse der mit Methode A bestimmten ACH-Abnahme­geschwindigkeit v im stromafreien dialysierten Hämoly­sat mit (in Klammern) und ohne NAD-Zusatz bei der jeweiligen ACH-Ausgangskonzentration. Das Hämoly­sat der Probanden A - E wurde bei 37° C und pH 7,4 mit verschiedenen ACH-Mengen inkubiert. Nach genau einer Stunde wurde der verbliebene ACH mit der Methode A im enteiweißten Probenüberstand bestimmt. Die Geschwindigkeit v ist in nM ACH/mg Hb/h angegeben.

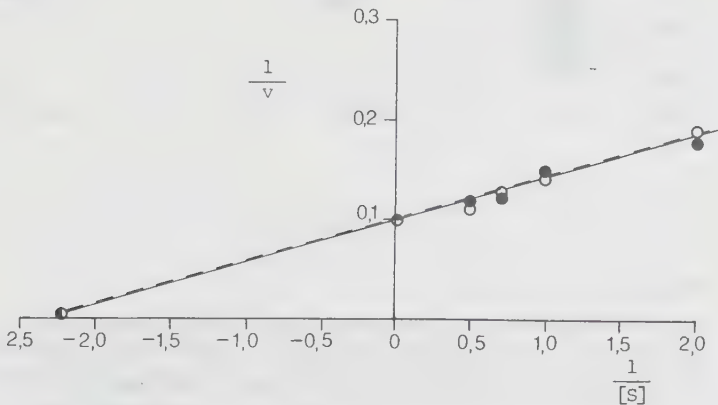


Abb. 21:

Reziproke Darstellung der Kurve aus Abb. 20 nach Lineweaver und Burk zur graphischen Bestimmung der Michaeliskonstanten k_m für ACH. Dargestellt ist die Kurve der Mittelwerte von 5 Probanden.

mit NAD-Zusatz (● — ●)

ohne NAD-Zusatz (○ — ○)

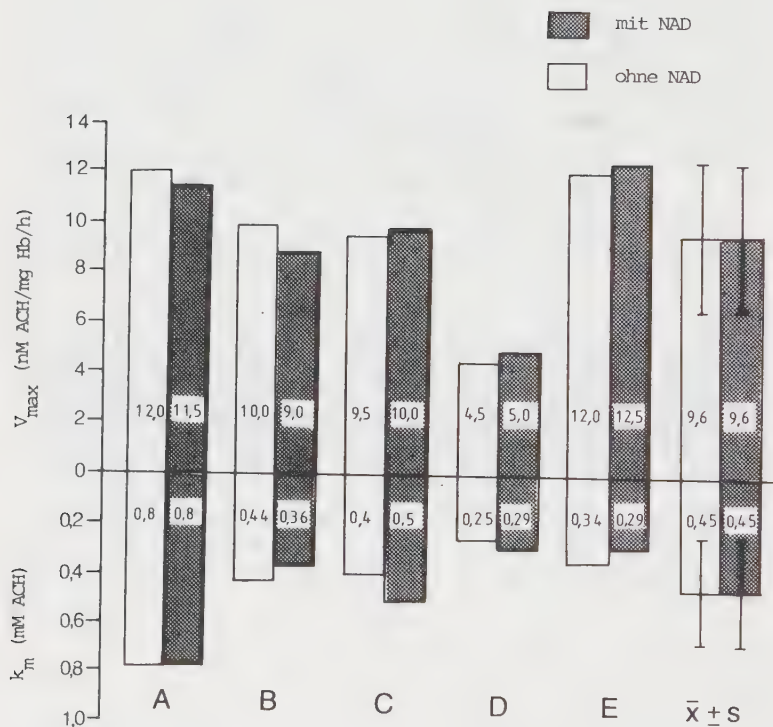


Abb. 22:

Maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeiten V_{max} , sowie die jeweiligen K_m -Werte für ACH im stromafreien dialysierten Hämolsat mit und ohne NAD-Zusatz. Die ACH-Bestimmung erfolgte nach genau 1 h Inkubation bei 37° C und pH 7,4 mit Methode A im entweißten Probenüberstand. Dargestellt sind die Einzelwerte der Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

C) DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Änderung des Acetaldehyd (ACH)-Gehaltes bei 37° C Inkubationstemperatur und physiologischem pH-Wert im Vollblut, in Erythrocytensuspensionen, im Erythrocytenhämolysat sowie im Serum untersucht, wobei zwei unterschiedliche gaschromatographische ACH-Bestimmungsmethoden verwendet wurden.

Bei der Methode A, von INOUE et al. (10) beschrieben, die in den Erythrocytensuspensionen sowie im Erythrocytenhämolysat verwendet wurde, wird der ACH nach Reaktionsabbruch durch Abzentrifugieren der Erythrocyten sowie durch Enteiweißung des Hämolysates mit 12 % Perchlorsäure im wässrigen Überstand bei 55° C Equilibrierungstemperatur bestimmt. Bei der Methode B wird der ACH-Gehalt bei 37° C in der Probe gemessen, ohne daß die ACH-Abnahmereaktion durch Zentrifugieren bzw. Eiweißfällung unterbrochen werden muß.

Dadurch wird die bei der Deproteinisierung im unterschiedlichen Ausmaß vorkommende Freisetzung des ACH aus der Proteinbindung bzw. die nicht-enzymatische Bildung des ACH aus Äthanol und somit die Bestimmung eines fälschlicherweise zu hohen ACH-Spiegels vermieden (18, 25).

Das Problem der ACH-Bildung aus Äthanol während der Deproteinisierung war bei den beschriebenen Versuchen nicht von Relevanz, da alle Probanden mindestens 24 Stunden Alkoholkarenz eingehalten hatten und alle Proben äthanolfrei waren. Weiterhin kann die ACH-Abnahme durch fortlaufende ACH-Messung zeitlich verfolgt und eine Konzentration-Zeit-Beziehung aufgestellt werden. Jeder beliebigen Substratkonzentration kann dann die jeweilige Substratumsatzgeschwindigkeit zugeordnet und daraus $V_{\max}$ und k_m bestimmt werden.

Nachteil der Methode B ist, daß bei der physiologischen Equilibrierungstemperatur von 37° C die Empfindlichkeit der gaschromatographischen ACH-Bestimmung im Vergleich zur Methode A, wo die Equilibrierungstemperatur 55° C beträgt, abnimmt.

Um den allein von der Equilibrierungstemperatur abhängigen Unterschied zwischen beiden Methoden ermitteln zu können, wurde der ACH-Gehalt in den Erythrocytensuspensionen nach 1 Stunde Inkubation mit verschiedenen ACH-Mengen einerseits mit der Methode A, d. h. bei 55° C im Überstand nach Abzentrifugieren der Erythrocyten, andererseits mit der Methode B, d. h. im Ansatz bei 37° C bestimmt.

Aus der Differenz der ACH-Ausgangsmenge und der nach 1 Stunde ermittelten ACH-Menge wurde die Abnahmegeschwindigkeit v formuliert und $V_{\max}$ und k_m zeichnerisch im Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelt. Somit war der Methodenunterschied, abgesehen vom Zentrifugieren der Erythrocyten, bei der keine Fehler zu erwarten sind, auf die Equilibrierungstemperatur beschränkt. Als maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$ in Erythrocyten-suspensionen wurde mit der Methode A $6,3 \pm 0,91$ nM ACH/mg Hb/h mit der Methode B $6,1 \pm 0,27$ nM ACH/mg Hb/h ermittelt. Im Lineweaver-Burk-Diagramm ergab sich mit den Werten von Methode A eine Michaelis-Konstante k_m für ACH von $0,57 \pm 0,07$ mM, mit den Werten von Methode B von $0,57 \pm 0,14$ mM. Die so durch die gaschromatographische ACH-Bestimmung bei beiden Methoden erhaltenen Parameter $V_{\max}$ und k_m stimmen mit den von INOUE et al. (10) erhaltenen Werten größenordnungsmäßig überein. Er ermittelte in intakten Erythrocyten eine k_m für ACH von ca. 0,43 mM. Die geringe Differenz der erhaltenen Werte für $V_{\max}$ und k_m bei Methode A und B zeigt, daß trotz der niedrigen Equilibrierungstemperatur bei Methode B beide Methoden, was Empfindlichkeit und Präzision betrifft, als gleichwertig zu betrachten sind.

Wesentliche Unterschiede für $V_{\max}$ und k_m treten im Hämolystat auf, wo als weitere entscheidende Methodenunterschiede

1. der unterschiedliche Berechnungsmodus für $V_{\max}$ und k_m
2. die Enteiweißung mit 12 % Perchlorsäure bei Methode A hinzukommen.

Während bei der Methode B, bedingt durch die Versuchsanordnung, jeder beliebigen Substratkonzentration $[S]$ die aktuelle Geschwindigkeit v zugeordnet und k_m bestimmt werden kann, wird bei der Methode A nach INOUE et al. (10) eine Durchschnittsgeschwindigkeit ermittelt, die man dadurch erhält, daß man den ACH 1 Stunde lang in der Probe inkubiert und dann, nach Reaktionsabbruch, aus der Differenz der ACH-Anfangsmenge und der nach 1 Stunde gemessenen, eine Abnahmegeschwindigkeit v bestimmt.

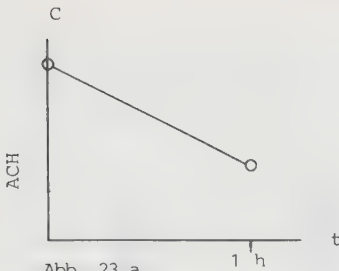


Abb. 23 a

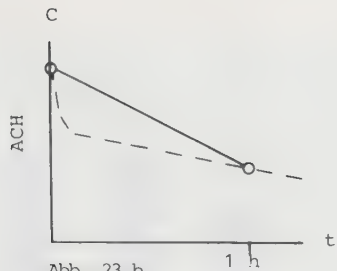


Abb. 23 b

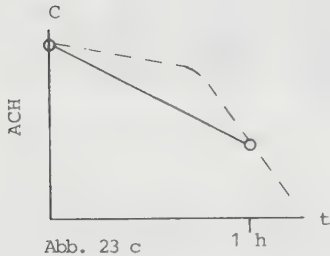


Abb. 23 c

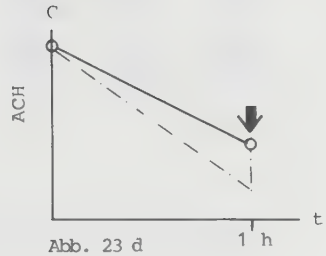


Abb. 23 d

Abb. 23 a - c:

Prinzipielle Darstellung der, durch den unterschiedlichen Berechnungsmodus bei Methode A und Methode B resultierenden, unterschiedlichen max. ACH-Abnahmegeschwindigkeiten $V_{\max}$.

- $V_{\max}$ -Berechnung bei Methode A (—) aus der Differenz zwischen ACH-Ausgangsmenge und der nach 1 h ermittelten ACH-Menge.
- $V_{\max}$ -Berechnung bei Methode B (---) durch fortlaufende ACH-Bestimmung in Erythrocytensuspensionen bei 37° C im Ansatz. Obwohl nach 1 h Inkubation mit ACH bei beiden Methoden die gleiche ACH-Menge bestimmt wird, ergibt sich bei Methode B eine, bedingt durch die am Anfang der ACH-Abnahmereaktion stattfindende beschleunigte ACH-Abnahme (Abbindung an die Erythrocytenmembran?) deutlich langsamere max. ACH-Abnahmegeschwindigkeit als bei Methode A (—).
- $V_{\max}$ -Berechnung bei Methode B (---) durch fortlaufende ACH-Bestimmung im HämolySAT bei 37° C. Obwohl nach 1 h Inkubation mit ACH bei beiden Methoden die gleiche ACH-Menge bestimmt wird, ergibt sich bei Methode B eine, bedingt durch die am Anfang der ACH-Abnahmereaktion stattfindende Reaktionsverzögerung, schnellere max. ACH-Abnahmereaktion als bei Methode A (—).

Abb. 23 d:

Möglicher Einfluß der bei Methode A (—) im HämolySAT stattfindenden Deproteinisierung auf die Höhe des ermittelten ACH-Spiegels. Nach 1 h Abnahme des ACH (---) wird durch Deproteinisierung der ACH-Spiegel erhöht und es wird ein fälschlicherweise zu hoher ACH-Spiegel, bzw. eine zu niedrige ACH-Abnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$ bestimmt.

Dabei wird eine lineare Abnahme des ACH (vgl. a in Abb. 23) in der Probe während der Inkubationszeit vorausgesetzt (20), die aber bei der fortlaufenden ACH-Bestimmung im Probenansatz (Methode B) nicht bestätigt werden kann.

So nahm der ACH im 45-minütigen Inkubationszeitraum mit durchschnittlich $7,1 \pm 0,57$ nM ACH/mg Hb/h im intakten Erythrocyten, bzw. $5,7 \pm 1,22$ nM ACH/mg Hb/h im hitzedenaturierten Erythrocyten erheblich schneller ab, als im gemessenen Kurventeil, wo die Abnahmegeschwindigkeit durch fortlaufende Bestimmung des ACH zu $2,1 \pm 0,52$ nM ACH/mg Hb/h im intakten Erythrocyten, bzw. $1,0 \pm 0,4$ nM ACH/mg Hb/h im hitzedenaturierten Erythrocyten betrug.

Es ist anzunehmen, daß vor allem am Anfang der Reaktion neben dem enzymatischen ACH-Abbau durch die Erythrocyten-ALDH, dessen max. Geschwindigkeit im gemessenen Kurvenabschnitt bestimmt wurde, eine bestimmte ACH-Menge auf nicht-enzymatischem Wege durch Proteinbindung oder Anlagerung an die Erythrocytenmembran verbraucht wird. Setzt man die gemessene, durch die Erythrocyten-ALDH hervorgerufene ACH-Abnahmegeschwindigkeit ebenfalls im Inkubationszeitraum voraus, so würde auf die chemische Bindung an die Erythrocytenmembran $3,8 \pm 0,64$ nM ACH/mg Hb in den Suspensionen mit intakten Erythrocyten und $3,5 \pm 1,13$ nM ACH/mg Hb in den Suspensionen mit hitzedenaturierten Erythrocyten entfallen, wobei die Einzelwerte bei den Probanden zwischen 2,8 und 4,4 nM ACH/mg Hb bzw. 1,7 und 4,5 nM ACH/mg Hb liegen (vgl. Abb. 24).

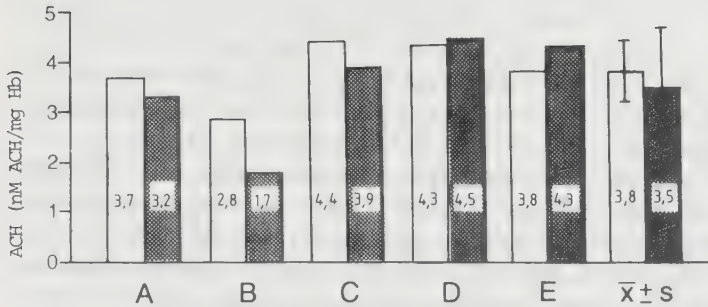


Abb. 24:

Absolute extrapolierte ACH-Menge in nm ACH/mg Hb, die an die Erythrocytenmembran gebunden wird. Dargestellt sind die Einzelwerte der 5 Probanden A - E sowie der Mittelwert $\bar{x} \pm s$.

Die ACH-Abnahmekurve in Erythrocytensuspensionen sieht dann schematisiert etwa wie Kurve b in Abb. 23 aus.

Berücksichtigt man diesen Proteinbindungseffekt nicht, wie es beim Berechnungsmodus für die Geschwindigkeit v bei der Methode A der Fall ist, so werden sämtliche Abnahmegeschwindigkeiten v fälschlicherweise zu hoch berechnet (vgl. a und b in Abb. 23).

Den genau entgegengesetzten Effekt konnten wir bei der fortlaufenden ACH-Bestimmung nach Methode B im Hämolysat feststellen.

Hier nahm der ACH im Inkubationsintervall mit $6,7 \pm 2,65$ nM ACH/mg Hb/h im Hämolysat ohne NAD-Zusatz, bzw. $6,1 \pm 2,42$ nM ACH/mg Hb/h im Hämolysat mit NAD-Zusatz erheblich langsamer ab, als im analytisch kontrollierten Intervall, wo die ACH-Abnahmegeschwindigkeit zu $9,1 \pm 0,88$ nM ACH/mg Hb/h im Hämolysat ohne NAD-Zusatz und $8,7 \pm 1,34$ nM ACH/mg Hb/h im Hämolysat mit NAD-Zusatz ermittelt wurde. Dieses Verhalten spiegelt, schematisiert gezeichnet, die Kurve c in Abb. 23 wieder. Berücksichtigt man diese Reaktionsverzögerung am Anfang der Inkubationszeit nicht, wie es beim Berechnungsmodus für die Abnahmegeschwindigkeit v bei der Methode A der Fall ist, so werden sämtliche ermittelten Geschwindigkeiten fälschlicherweise zu niedrig berechnet. Eine endgültige Erklärung für diese Reaktionsverzögerung, die bei allen Probanden beobachtet wurde, steht aus. Denkbar wären z.B. Temperatur- und Substratinhomogenitäten. Offensichtlich scheint aber das Hämolysat, im Gegensatz zu den Erythrocyten, nicht die Eigenschaft zu besitzen, nennenswerte ACH-Mengen an sein Protein zu binden.

Der Einfluß des Enteiweißungsprozesses auf die ACH-Bestimmung wurde bei den beschriebenen Versuchen nicht untersucht. PIKKARAINEN et al. (18) sowie v. WARTBURG (25) berichten aber von einer Erhöhung des ACH während der Deproteinisierung, die einerseits durch Verdrängung des ACH aus der Proteinbindung, andererseits durch die nicht-enzymatische ACH-Bildung aus Äthanol bedingt sein soll. Die so erhaltenen ACH-Werte würden dann jeweils fälschlicherweise zu hoch ausgedrückt werden (vgl. d in Abb. 23).

Die nicht-enzymatische ACH-Bildung aus Äthanol dürfte bei unseren Versuchen keine Rolle gespielt haben, da die Probanden 24 Stunden Alkoholkarenz eingehalten haben und sämtliche Proben äthanolfrei waren.

Einen ebenfalls geringen Einfluß auf die Höhe des gemessenen ACH-Spiegels dürfte die genannte Verdrängung des ACH aus der Proteinbindung während der Enteiweißung spielen, da, wie oben bereits gezeigt, das Protein des Hämolysats wahrscheinlich nur vernachlässigbar geringe ACH-Mengen abzubinden vermag.

Die bei beiden Methoden erhaltenen, zum Teil erheblich unterschiedlichen Ergebnisse für $V_{\max}$ und k_m dürften somit im wesentlichen auf den unterschiedlichen Berechnungsmodus für die Geschwindigkeit v zurückzuführen sein.

Es sei an dieser Stelle ausdrücklich bemerkt, daß trotz der gezeigten Vorteile der Methode B gegenüber der Methode A, keine der beiden Methoden vollständig den Kriterien für die Berechnung der enzymkinetischen Parameter $V_{\max}$ und k_m nach Michaelis und Menten genügt, wenngleich auch durch die aktuelle Geschwindigkeitsbestimmung und die Vermeidung der Deproteinisierung bei der Methode B, die bei der Methode A durch die Formulierung einer Durchschnittsgeschwindigkeit (vgl. c Abb. 23) und die, im geringeren Maße bei der Deproteinisierung auftretenden, in die Meßwerte eingehenden Fehler vermieden werden können. Vergleiche mit k_m -Werten, die unter den Bedingungen von Michaelis und Menten photometrisch erhalten wurden, sind somit mit aller gebotenen Vorsicht anzustellen.

Während die im Hämolysat erhaltenen max. ACH-Abnahme-Geschwindigkeiten bei beiden Methoden nur geringe Unterschiede zeigen - sie wurden mit Methode A im Hämolysat ohne NAD-Zusatz zu $9,6 \pm 3,07$ nM ACH/mg Hb/h und $9,6 \pm 2,9$ nM ACH/mg Hb/h im Hämolysat mit NAD-Zusatz, mit Methode B entsprechend zu $9,1 \pm 0,88$ nM ACH/mg Hb/h und $8,7 \pm 1,34$ nM ACH/mg Hb/h ermittelt - liegen die k_m -Werte für ACH um den Faktor 10 auseinander. Dabei muß aber betont werden, daß die nach der Methode B ermittelten k_m -Werte für ACH Schätzwerte darstellen, die, wie auf Abb. 18 gezeigt ist, unter der Voraussetzung erhalten werden, daß die untere Grenze bis zu der hin die Substratumsatzkurve (Abb. 14) linear, d. h. bei Enzymsättigung verläuft, bei $100 \mu\text{M}$ liegt.

Da sie aber bei allen Probanden deutlich unter $100 \mu\text{M}$ liegt, dürfte der k_m -Wert für ACH, der bei allen Probanden auf etwa $40-80 \mu\text{M}$ geschätzt wird, als oberer Grenzwert anzusehen sein. Dieser mit Methode B erhaltene k_m -Wert stimmt mit dem von GOEDDE und AGARWAL (7) für die Erythrocyten-ALDH berechneten k_m -Wert für ACH überein.

Sie bestimmten mit einer elektrophoretischen Methode die Erythrocyten-ALDH als das ALDH-Isoenzym II und gaben die Michaelis-Konstante für dieses Isoenzym mit $94 \mu\text{M}$ für Proionaldehyd an. Für das Substrat Acetaldehyd haben sie einen ähnlichen Wert gefunden. Dabei wurde das ALDH-Isoenzym II aus der Leber, nicht aus den Erythrocyten, dargestellt (7) und die enzymkinetischen Untersuchungen wurden photometrisch durchgeführt.

Somit wird mittels der gaschromatographischen ACH-Bestimmung im Hämolysat unter Verwendung der Methode B, d. h. durch direkte Bestimmung des ACH-Umsatzes, der k_m -Wert für die Erythrocyten-ALDH bestätigt, der durch photometrische Messung mit gereinigtem ALDH-Isoenzym II erhalten wurde.

Die durch Methode A nach INOUE et al. (10) für das Substrat ACH erhaltenen k_m -Werte für die ACH-Abnahme im Hämolysat von $0,45 \pm 0,22 \text{ mM}$ im dialysierten Hämolysat mit NAD-Zusatz stimmen mit den von INOUE et al. (10) ermittelten Werten überein. Die von ihm, aufgrund der, nach Methode A ermittelten k_m -Werte für ACH, diskutierte Identität der Erythrocyten-ALDH mit der cytosolischen Leber-ALDH, welche eine hohe k_m für ACH von $0,5 - 3 \text{ mM}$ besitzt, kann nach den Bestimmungen der Kinetik des ACH im Hämolysat mittels Methode B in Übereinstimmung mit den von GOEDDE und AGARWAL (7) berichteten Ergebnissen über die Erythrocyten-ALDH nicht bestätigt werden.

Auffällig ist, daß weder mit Methode A, noch mit Methode B eine NAD-Abhängigkeit der ACH-Abnahme festzustellen war. Die maximale ACH-Abnahmegeschwindigkeit wurde mit Methode A zu $9,6 \pm 3,07 \text{ nM ACH/mg Hb/h}$ (ohne NAD-Zusatz) und $9,6 \pm 2,9 \text{ nM ACH/mg Hb/h}$ (mit NAD-Zusatz), mit Methode B zu $9,1 \pm 0,88 \text{ nM ACH/mg Hb/h}$ (ohne NAD-Zusatz) und $8,7 \pm 1,34 \text{ nM ACH/mg Hb/h}$ (mit NAD-Zusatz) bestimmt, wobei 50 % der ACH-Ausgangsmenge im Hämolysat ohne NAD-Zusatz nach $126,6 \pm 14,80 \text{ min.}$, im Hämolysat mit NAD-Zusatz nach $133,4 \pm 16,73 \text{ min.}$ nicht mehr nachweisbar war.

Dieses Verhalten steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von INOUE et al. (10), der einen totalen Verlust der ACH-abbauenden Aktivität im dialysierten Hämolysat feststellte und nach Zugabe von 1 mM NAD eine Aktivitätssteigerung um das Dreifache, verglichen mit der Aktivität im Erythrocyten, erhielt. GOEDDE und AGARWAL (7) gaben für das ALDH-Isoenzym II eine k_m für das Substrat NAD von 24 μ M an.

Eine Erklärung für die nicht festgestellte NAD-Abhängigkeit des ACH-Umsatzes steht noch aus. Denkbar wäre eine unvollständige Entfernung des Co-Enzyms aus dem Hämolysat, bedingt durch eine zu kleine Menge an 15 mM Natrium-Phosphat-Puffer, der als Dialyseflüssigkeit verwendet wurde, sowie durch die Notwendigkeit, den Puffer während des Dialysevorganges mehrere Male zu wechseln, was bei den beschriebenen Versuchen nicht geschah.

Bereits geringe Restmengen an NAD würden - angesichts der kleinen k_m des ALDH-Isoenzyms II für NAD - eine deutlich meßbare ACH-Abnahme bewirken.

Werden die Erythrocyten und das Hämolysat 1 Stunde lang auf 60° C erhitzt, so zeigt sich eine deutlich herabgesetzte Substratumsatzaktivität, die bei den hitzebehandelten Erythrocyten mit einer $53,6 \pm 15,2\%$ -Reduktion, verglichen mit einer $72 \pm 2,9\%$ -Reduktion im Hämolysat ohne NAD, bzw. $73 \pm 0,57\%$ -Reduktion im Hämolysat mit NAD etwas geringer ausfällt. Diese Substratumsatzreduktion ist auf eine Zerstörung, bzw. eine Teilinaktivierung der ALDH im Erythrocyten durch die hohe Temperatur zurückzuführen.

Die, wenn auch stark vermindert, weitergehende ACH-Abnahme kann man durch eine weiterlaufende Bindung oder Anlagerung des ACH an das Protein oder an die Erythrocytenmembran, aber auch durch eine erhalten gebliebene Restaktivität des Enzyms erklären. Der Versuch zeigt aber, daß der überwiegende Anteil des ACH durch einen enzymatischen Vorgang zum Verschwinden gebracht wird.

Vergleicht man die mit Methode B erhaltenen max. ACH-Abnahmegeschwindigkeiten $V_{\max}$, die in Erythrocytensuspensionen zu $2,1 \pm 0,52$ nM ACH/mg Hb/h, im Hämolysat ohne NAD zu $9,1 \pm 0,88$ nM ACH/mg Hb/h bzw. zu $8,7 \pm 1,34$ nM ACH/mg Hb/h im Hämolysat mit NAD bestimmt wurden, so zeigt sich, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der enzymatischen ACH-Oxydation im Blut durch die Erythrocyten-ALDH der Durchtritt des ACH durch die Erythrocytenmembran ist.

Die Acetaldehydabnahme im Plasma zeigt lediglich eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration, während eine Zeitabhängigkeit, zumindest im Zeitraum nach der Mindestinkubation, nicht festzustellen ist. Offensichtlich handelt es sich hierbei um eine reine Abbindungsreaktion von ACH an das Plasma-protein. Je nach Substratkonzentration werden zwischen 13,6 % und 19,7 % der ACH-Ausgangsmenge gebunden. Dagegen fällt der von v. WARTBURG (25) angegebene Wert von $4,4 \pm 2,7$ % für den Anteil des an das Plasmaeiweiß gebundenen Acetaldehyds niedrig aus, wobei aber zu beachten ist, daß dabei das Plasma nur 5 min. mit nur 0,1 mM ACH inkubiert und der ACH nach Deproteinisierung mit Perchlorsäure gaschromatographisch bestimmt wurde.

Das Fehlen einer enzymatischen ACH-Oxydation im Plasma wird auch von GOEDDE und AGARWAL (7) beschrieben, die im menschlichen Plasma elektrophoretisch keine ALDH-Isoenzymbande nachweisen konnten. Unter den sich fast gleichförmig verhaltenden Probandenplasmen bildet lediglich das Probandenplasma E eine Ausnahme, das, verglichen mit der Abbindungskapazität der übrigen Plasmen, etwa nur die Hälfte an ACH abzubinden vermag. Die Ursache für dieses Verhalten ist bisher noch nicht geklärt. Offenbar besitzt das Plasmaeiweiß des Probanden E weniger Bindungsstellen für ACH als das Eiweiß der übrigen Probandenplasmen, was z.B. durch Bindung von Arzneimitteln an das Plasmaprotein oder durch eine Verringerung des Eiweißgehaltes hervorgerufen werden könnte. Die Arzneimittelanamnese des Probanden E war jedoch leer. Eine Bestimmung seines Gesamteiweißes, bzw. eine Elektrophorese wurde nicht vorgenommen.

Die ACH-Abnahme im frischen Vollblut, die eine komplexe Überlagerung von Bindung oder Anlagerung des ACH an Protein und an die Erythrocytenmembran mit der Oxydation des ACH durch die Erythrocyten-ALDH darstellt, verwischt fast vollständig die Probandenunterschiede, die sich bei der isolierten Betrachtung des ACH-Verhaltens in Plasma, Erythrocyten-suspensionen und Hämolysat ergeben haben.

Nach $115,4 \pm 2,07$ min. ist der ACH-Gehalt im Vollblut von 2 mM auf 1 mM gefallen und nach 5 h sind nur noch $13,7 \pm 2,3$ % der ACH-Ausgangsmenge nachweisbar.

v. WARTBURG berichtet von einer $51,4 \pm 5,3$ % ACH-Abnahme im Vollblut innerhalb von 5 min. Inkubation, wobei er aber die Vollblutproben mit nur 0,1 mM ACH inkubierte.

Extrapoliert man, einen Kurvenverlauf bei Enzymsättigung vorausgesetzt, dieses Ergebnis auf 2 mM ACH-Ausgangsmenge, so besteht größenordnungsmäßig Übereinstimmung mit dem von uns erhaltenen Ergebnis.

Diese Werte zeigen, daß man im Blut ein äußerst wirksames Puffersystem zu sehen hat, welches hinter den Hauptabbauort des ACH, die Leber, geschaltet ist und eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Entgiftung des Körpers von ACH spielen könnte.

D) ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten des Acetaldehyds (ACH) im menschlichen Vollblut, Plasma, in Erythrocytensuspensionen sowie im Erythrocytenhämolysat bei 37° C und pH 7,4 mit einer gaschromatographischen Bestimmungsmethode (Methode B) untersucht, die es ermöglicht, den ACH-Gehalt bei 37° C Equilibrierungstemperatur fortlaufend in den Proben zu bestimmen, ohne daß eine vorausgehende Enteiweißung notwendig ist. Aus der dabei erhaltenen ACH-Abnahmekurve kann jeder beliebigen Substratkonzentration $[S]$ die aktuelle Substratumsatzgeschwindigkeit v zugeordnet und die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit $V_{\max}$ sowie die Michaelis-Konstante k_m ermittelt werden.

Dies ist mit der ACH-Bestimmungsmethode A nach INOUE et al. (10) nicht möglich. Hierbei wird der ACH-Gehalt nach 1 Std. Inkubation im enteweißten wässrigen Überstand bestimmt. Aus der Differenz der ACH-Ausgangsmenge und der ACH-Endmenge formuliert man dann eine durchschnittliche Substratumsatzgeschwindigkeit v . Hierbei gehen möglicherweise verschiedene Fehler ein.

So hat sich beim Erstellen der ACH-Abnahmekurve in den Erythrocytensuspensionen mittels der Methode B gezeigt, daß am Anfang der Inkubationszeit bei allen Probanden eine gewisse Menge ACH durch einen nicht-enzymatischen Prozeß verbraucht wird, wobei eine chemische Bindung oder eine Anlagerung des ACH an die Erythrocytenmembran denkbar wäre. Wird dieser nicht-enzymatische Verbrauch an ACH nicht bestimmt und berücksichtigt, wie dies bei der Bestimmung der Substratumsatzgeschwindigkeit v bei der Methode A nach INOUE et al. (10) der Fall ist, so wird v fälschlicherweise zu hoch bestimmt.

Umgekehrt hat sich beim Erstellen der ACH-Abnahmekurve im Hämolysat mittels der Methode B gezeigt, daß der ACH in der Inkubationszeit langsamer abnimmt, als dies die gemessene Aktivität der Aldehyddehydrogenase hätte erwarten lassen.

Ob dabei Substrat- oder Temperaturinhomogenitäten oder sonstige Einflüsse eine Rolle gespielt haben, wurde nicht untersucht, sodaß eine endgültige Erklärung aussteht. Wird diese Reaktionsverzögerung aber nicht berücksichtigt, wie dies bei der Methode A der Fall ist, so wird die Substratumsatzgeschwindigkeit v fälschlicherweise zu niedrig berechnet.

Vergleichende Untersuchungen in Erythrocytensuspensionen haben gezeigt, daß beide Methoden, was Präzision und Empfindlichkeit betrifft, als gleichwertig zu betrachten sind. Die erhaltenen Unterschiede für $V_{\max}$ und k_m der ACH-Abnahme im Hämolysat könnten somit nur durch die Enteiweißung mit 12 % Perchlorsäure bei Methode A oder durch den unterschiedlichen Bestimmungsmodus für die ACH-Abnahmegeschwindigkeit v erklärt werden. Da alle Proben Äthanolfrei waren, scheidet die Möglichkeit der nicht-enzymatischen ACH-Bildung aus Äthanol (25) aus. Ebenso dürfte eine säurebedingte Erhöhung des ACH-Gehalts durch Verdrängung des ACH aus der Proteinbindung wegen der geringen Bindungskapazität des Proteins im Hämolysat vernachlässigbar gering sein.

Deshalb kann angenommen werden, daß die erhaltenen Unterschiede für $V_{\max}$ und k_m der ACH-Abnahme auf den unterschiedlichen Berechnungsmodus für die Substratumsatzgeschwindigkeit v zurückzuführen sind.

Während die $V_{\max}$ -Werte der ACH-Abnahme im Hämolysat mit NAD-Zusatz bei Methode A zu $9,6 \pm 2,9$ nM ACH/mg Hb/h bestimmt wurden und nur geringe Unterschiede zu dem mit Methode B erhaltenen $V_{\max}$ -Wert von $8,7 \pm 1,34$ nM ACH/mg Hb/h zeigen, liegen die k_m -Werte für ACH um den Faktor 10 auseinander. Mit Methode A wurde eine k_m für ACH von $0,45 \pm 0,22$ mM ACH ermittelt. Dieser Wert stimmt mit dem von INOUE et al. (10) ermittelten Wert größenordnungsmäßig überein. Mit Methode B wurde ein k_m -Wert für ACH ermittelt, der deutlich unter $100 \mu\text{M}$ liegt und auf ca. $40\text{--}80 \mu\text{M}$ ACH geschätzt wird.

Dieser Wert stimmt mit dem von GOEDDE und AGARWAL (7) ermittelten k_m -Wert für das aus der Leber isolierte ALDH-Isoenzym II überein, so daß angenommen werden kann, daß die Erythrocyten-ALDH mit dem ALDH-Isoenzym II identisch ist.

Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen von GOEDDE und AGARWAL (7), die elektrophoretisch die Erythrocyten-ALDH als das ALDH-Isoenzym II identifiziert haben.

Eine NAD-Abhängigkeit des ACH-Umsatzes konnte nicht gefunden werden, wobei als mögliche Ursache eine unvollständige Entfernung des Co-Enzyms aus dem Hämolysat während des Dialysevorganges wahrscheinlich ist.

Da die ACH-Abnahmegeschwindigkeit im Hämolysat mehr als viermal so schnell ist wie in der Erythrocytensuspension, ist zu folgern, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der enzymatischen ACH-Oxydation im Blut durch die Erythrocyten-ALDH der Durchtritt des ACH durch die Erythrocytenmembran ist.

Wurden die Erythrocyten und das Hämolysat auf 60° C erhitzt, zeigt sich in den Erythrocytensuspensionen eine Reduktion der Substratumsatzaktivität von $53,6 \pm 15,21$ %, im Hämolysat mit NAD-Zusatz von $72 \pm 2,9$ %. Diese Reduktion der Substratumsatzaktivität ist auf eine Inaktivierung der Erythrocyten-ALDH durch die hohe Temperatur zurückzuführen.

Die ACH-Abnahme im Plasma zeigt lediglich eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration während eine Zeitabhängigkeit nicht nachweisbar ist, sodaß eine enzymatische ACH-Oxydation ausgeschlossen werden kann. Dies stimmt mit den Ergebnissen von GOEDDE und AGARWAL (7) überein, die elektrophoretisch keine ALDH-Isoenzymbande im Plasma nachweisen konnten.

Bei der Bestimmung der ACH-Abnahme im menschlichen Vollblut fand sich, daß nach 5 Stunden Inkubation $11,46 \pm 0,23$ nM ACH/mg Hb bzw. $86,3 \pm 2,3$ % der ACH-Ausgangsmenge von 2 mM nicht mehr nachweisbar waren.

Diese Werte zeigen, daß das Blut eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Entgiftung des Körpers von ACH spielen könnte.

E) LITERATURVERZEICHNIS

1. Akabane, J. (1970):
Aldehydes and related compounds. In: Alcohols and Derivatives.
International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.
Sect. 20. Vol. 2. edited by Tremoheres, 523-560.
Pergamon Oxford.
2. Asmussen, E., Hald, J. & Larsen, V. (1948):
Acta Pharmacol. Toxicol. (Kbh) 4, 311 - 320.
3. Berger, D., Berger, M., and von Wartburg, J. P. (1974):
Structural Studies of human liver alcohol dehydrogenase isoenzymes.
Eur. J. Biochem. 50, 215 - 225.
4. Blair, A. H. & Bodley, F. H. (1975):
Can. J. Biochem. 47, 265 - 272.
5. Davis, V. E. & Walsh, M. J. (1970):
Science 167, 1005 - 1007.
6. Dubi, A. M., von Wartburg, J. P., Bohlken, D. P., and Plapp, V. B. (1977):
Characterization and kinetics of native and chemically activated human liver alcohol dehydrogenase.
J. Bio. Chem. 252, 1464 - 1470.
7. Goedde, H. W., Agarwal, D. P. (1981):
Alkohol-metabolisierende Enzyme: Eigenschaften, genetisch bedingte Heterogenität und Bedeutung für den Alkoholstoffwechsel des Menschen.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 179 - 189.
8. Greenfield, N. J. & Pietrusko, R. (1977):
Biochim. Biophys. Acta 483, 35 - 45.
9. Harada, S., Agarwal, D. P. & Goedde, H. W. (1978):
Hum. Genet. 44, 181 - 185.
10. Inoue, K., Ohbora, A. and Yamasawa, K. (1978):
Metabolism of acetaldehyde by human erythrocytes
Life Sct 23, 179 - 184.
11. Inoue, K., Nishimuka, H. and Yamasawa, K. (1979):
Purification and partial characterization of aldehyde Dehydrogenase from Human Erythrocytes.
Biochem. and Biophys. Acta 569, 117 - 123.
12. Korsten, M.A., Matsuzaki, A., Feinman, I., and Lieber, C. S. (1975):
High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. Difference between alcoholic and non-alcoholic subjects.
N. Engl. J. Med. 292, 386 - 389.

13. Krebs, H. A. and Perkins, J. R. (1970):
The physiological role of liver alcohol dehydrogenase.
Biochem. J. 118, 635 - 644.
14. Lieber, C. S. (1977):
Metabolism of ethanol. In: Metabolic aspects of alcoholism,
edited by C. A. Lieber. pp. 1-30. MTP Press, Lancaster.
15. Mizoi, Y., Ijiti, I. & Tatsuno, Y. (1979):
Pharm. Biochem. Behaviour 10, 303 - 311.
16. Moser, K., Papenberg, J. and von Wartburg, J. P. (1968):
Organverteilung und Heterogenität der Alkoholdehydrogenase
bei verschiedenen Spezies.
Enzym. Biol. Clin. 9, 447 - 458.
17. Peterson, D. R., Collins, A. C. and Deitrich, R. A. (1977):
Role of Liver cytosolic Aldehyd Dehydrogenase Isoenzymes in
Control of Blood acetaldehyd concentrations.
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics
201, 471 - 481.
18. Pikkarainen, P. H., Salespuro, M. P., Lieber, C. S. (1979):
A Method for the Determination of Free Acetaldehyd in
Plasma.
Alcoholism:
Clinical and Experimental Research 3, 259 - 261
19. Smith, M., Hopkins, D. A. and Harris, H. (1971):
Developmental changes and polymorphism in human alcohol-
dehydrogenase.
Inn. Hum. Genet. 34, 251 - 271.
20. Smith, M., Hopkins, D. A. and Harris, H. (1972):
Alcohol dehydrogenase isoenzymes in adult human stomach
and liver: Evidence for activity of the ADH₃ locus.
Ann. Hum. Genet. 35, 243 - 253.
21. Smith, M., Hopkins, D. A. and Harris, H. (1973):
Studies on the subunit structure and molecular size of
the human alcohol dehydrogenase isoenzymes determined by
the different loci ADH₁, ADH₂, ADH₃.
Ann. Hum. Genet. 36, 401-414.
22. Smith, M., Hopkins, D. A. and Harris, H. (1973):
Studies on the properties of the human alcohol dehydro-
genase isoenzymes determined by the different loci, ADH₁,
ADH₂, ADH₃.
Ann. Hum. Genet. 37, 49 - 67.
23. Stowell, A. R., Greenway, R. M. and Batt. R. D. (1977):
Acetaldehyd Formation during Deproteinization of Human
Blood Samples containing Ethanol.
Biochem. Medicine 18, 392 - 401.

24. von Wartburg, J. P. (1971):
The Metabolism of alcohol in normals and alcoholics:
Enzymes. In: The Biology of Alcoholism, Vol. 1, edited by
B. Kissin and H. Begleiter. pp. 63 - 102 Plenum, New York.
25. von Wartburg, J. P. (1980):
Acetaldehyd, Raven Press, New York, 137 - 147.

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut.

Herrn Professor Dr. G. Machbert danke ich für die Überlassung des Themas und seine bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Tante, Frau Ingeborg Schmidberger, für die Durchführung der Schreibarbeiten, sowie all denen, die durch ihre Blutspende zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Am 01. Februar 1956 wurde ich als Sohn des technischen Angestellten Anton Schöninger und seiner Ehefrau Maria, geb. Schinko, in Feuchtwangen geboren.

Vom September 1962 bis Juli 1967 besuchte ich die Volksschule in Bechhofen a. d. Heide. Danach trat ich in das Platen-Gymnasium in Ansbach ein, wo ich am 25. Juni 1976 die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Im Sommersemester 1977 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Hier legte ich am 03. April 1979 das Physikum, am 11. April 1980 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, am 02. April 1982 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und am 11. Mai 1983 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit Erfolg ab.

Am 18. Mai 1983 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Seit dem 15. Juni 1983 arbeite ich als chirurgischer Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus in Schillingsfürst.

